

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen

In vitro-Untersuchungen zur Bildung und Metabolisierung konjugierter Östrogene in der Rinderplazenta während der Gravidität und unter der Geburt

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Kerstin Falter

Gießen 1999

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. B. Hoffmann

**In vitro-Untersuchungen zur Bildung
und Metabolisierung konjugierter
Östrogene in der Rinderplazenta
während der Gravidität und unter der
Geburt**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Kerstin Falter
Tierärztin aus Lollar (Hessen)

Gießen 1999

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität
Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bostedt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Hoffmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Schoner

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.1999

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Östrogene im maternalen und fetalen Blutkreislauf während der Trächtigkeit	3
2.2 Herkunft und Bildung der graviditätsspezifischen Östrogene	4
2.3 Wirkungsweisen von Östrogenen	4
2.3.1 Genomische Östrogenwirkung	5
2.3.2 Nicht-genomische Östrogenwirkung	5
2.3.2.1 Nicht-genomische rezeptorabhängige Östrogenwirkungen	6
2.3.2.2 Nicht-genomische rezeptorunabhängige Östrogenwirkungen	7
2.4 Biologische Bedeutung der plazentaren Östrogenproduktion	7
2.4.1 Bedeutung im Verlauf der Trächtigkeit	8
2.4.2 Bedeutung unmittelbar ante partum	9
2.5 Regulation der Aktivität von plazentaren Östrogenen	10
2.5.1 Östrogensulfotransferase	10
2.5.1.1 Expression der Östrogensulfotransferase	11
2.5.1.2 Östrogensulfotransferase in der Plazenta des Menschen	11
2.5.1.3 Die Östrogensulfotransferase bei anderen Säugetieren	12
2.5.1.4 Östrogensulfotransferase beim Rind	15
2.5.2 Steroidsulfatase	16
2.5.2.1 Die Sulfatase in der Plazenta des Menschen	16
2.5.2.1.1 Klassifizierung der Sulfatasen	16
2.5.2.1.2 Enzymeigenschaften	17
2.5.2.1.3 Steroidsulfatasemangel der menschlichen Plazenta	18
2.5.2.2 Die Steroidsulfatase bei anderen Säugetieren	19
2.5.2.3 Steroidsulfatase beim Rind	21
2.6 Ziel der eigenen Untersuchungen	22

3	Material und Methoden	23
3.1	Tiermaterial und Probenentnahme	23
3.2	Präparation des Gewebes	24
3.3	Aufbereitung der Gewebe	25
3.3.1	Herstellung der Homogenate	25
3.3.2	Herstellung der subzellulären Fraktionen	25
3.4	Untersuchungen der Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und Steroidsulfatase unter Zugabe von exogenen Substraten	26
3.4.1	Herstellung der ³ H-markierten Substratlösungen	26
3.4.2	Herstellung der Kontrollansätze	26
3.4.3	Inkubationsansätze unter Verwendung von Gewebehomogenaten	26
3.4.4	Inkubationsansätze unter Verwendung von subzellulären Fraktionen	27
3.4.5	Inkubationsansätze zur Untersuchung der Substratspezifität der Östrogensulfotransferase	27
3.4.6	Weiterführende Untersuchungen zur Steroidsulfatase	28
3.4.6.1	Inkubationsansätze zur Untersuchung der Substratspezifität	28
3.4.6.2	Untersuchung zur kompetitiven Hemmung der Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat durch Estronsulfat	28
3.4.7	Aufbereitung und Auswertung der Inkubationsansätze	29
3.5	Begleitende Untersuchungen zum Verlauf der endogenen Steroidkonzentrationen in Plazenta und peripherem Blutplasma	30
3.5.1	Bestimmungen fetaler und maternaler Steroidkonzentrationen im peripheren Blutplasma	30
3.5.2	Radioimmunologische Bestimmungsverfahren	31
3.5.2.1	Radioimmunologische Bestimmung von Cortisol	31
3.5.2.2	Radioimmunologische Bestimmung von Progesteron	31
3.5.2.3	Radioimmunologische Bestimmung von Estron bzw. Estronsulfat	31
3.5.2.4	Radioimmunologische Bestimmung von Estradiol-17β	32
3.5.3	Bestimmungen der endogenen Steroidkonzentrationen in der Plazenta mittels HPLC-RIA	32
3.5.3.1	Extraktion der freien Östrogene	32
3.5.3.2	Enzymatische Hydrolyse und Extraktion der konjugierten Östrogene	33
3.5.3.3	Säulenchromatographische Vorreinigung	33

3.5.3.4	Aufbau der Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Anlage (HPLC)	34
3.5.3.5	Durchführung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	34
3.5.3.6	Radioimmunologische Bestimmung der endogenen Hormongehalte der Gewebe: Estron und Estradiol-17 β	35
3.5.3.7	Radioimmunologische Bestimmung von Estradiol-17 α nach Auftrennung in der HPLC	36
3.6	Auswertung der Ergebnisse und statistische Berechnungen	36
3.7	Liste der verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Pufferlösungen	38
3.7.1	Chemikalien	38
3.7.2	^3H -markierte Steroide	38
3.7.3	Materialien und Geräte	39
3.7.4	Herstellung der Pufferlösungen	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Untersuchung auf das Vorkommen von Östrogensulfotransferase durch Darstellung der Sulfokonjugation von ^3H -Estron zu ^3H -Estronsulfat	42
4.1.1	Inkubationen mit Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe	42
4.1.1.1	Einfluß des Trächtigkeitsstadiums	42
4.1.1.2	Einfluß der Gewebeherkunft	43
4.1.2	Inkubationen mit subzellulären Fraktionen	44
4.1.3	Untersuchung zur Substratspezifität der Östrogensulfotransferase	47
4.2	Untersuchungen auf das Vorkommen von Steroidsulfatase durch Erfassung der Umwandlung von ^3H -Estronsulfat zu ^3H -Estron	48
4.2.1	Inkubationen mit Homogenaten aus Kotyledonen- und Karunkelgewebe	48
4.2.1.1	Einfluß des Trächtigkeitsstadiums	48
4.2.1.2	Einfluß der Gewebeherkunft	49
4.2.2	Inkubationen mit subzellulären Fraktionen	51
4.2.3	Substratspezifität der Steroidsulfatase	53
4.2.4	Versuche zur kompetitiven Hemmung der Steroidsulfatase	54
4.3	Begleitende Pilotuntersuchungen zur Bedeutung konjugierter Östrogene während der Gravidität des Rindes	55
		III

4.3.1	Sulfokonjugation von ^3H -Estron und Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat in Homogenaten aus Myometrium	55
4.3.2	Sulfokonjugation von Estron und Hydrolyse von Estronsulfat in Homogenaten aus Lutealgewebe gravider bzw. zyklischer Rinder	59
4.4	Steroidhormonkonzentration im Blutplasma der Versuchstiere	61
4.5	Steroidhormonkonzentration in der Plazenta der Versuchstiere	64
5	Diskussion	66
5.1	Diskussion der Methodik	66
5.2	Diskussion der Ergebnisse	67
5.2.1	Steroidhormonkonzentrationen im Blut	67
5.2.2	Abhängigkeit der Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und Steroidsulfatase vom Trächtigkeitsstadium sowie Veränderungen der Enzymaktivitäten unter der Geburt	68
5.2.3	Verteilung der Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und Steroidsulfatase zwischen Karunkel- und Kotyledonengewebe	69
5.2.4	Subzelluläre Verteilung der Enzymaktivität	69
5.2.5	Substratspezifität der Enzyme	70
5.2.6	Enzymaktivität im Myometrium	71
5.2.7	Enzymaktivität im Corpus luteum	71
5.3	Interpretation der Ergebnisse aus funktioneller Sicht	72
5.3.1	Mögliche Funktionen der Östrogensulfotransferase in der Plazenta des Rindes	72
5.3.2	Mögliche Funktionen der Steroidsulfatase in der Plazenta des Rindes	72
6	Zusammenfassung	74
7	Summary	77
8	Literaturverzeichnis	79

9	Tabellenanhang	97
9.1	Proteingehalt in den subzellulären Fraktionen bei der Inkubation	97
9.2	Ergebnisse aus den Untersuchungen auf das Vorkommen von Östrogensulfotransferase durch Darstellung der Sulfokonjugation von ^3H -Estron zu ^3H -Estronsulfat	99
9.2.1	Inkubationen mit Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe	99
9.2.2	Inkubationen mit subzellulären Fraktionen	102
9.3	Ergebnisse aus den Untersuchungen auf das Vorkommen von Steroidsulfatase durch Erfassung der Umwandlung von ^3H -Estronsulfat zu ^3H -Estron	108
9.3.1	Inkubationen mit Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe	108
9.3.2	Inkubationen mit subzellulären Fraktionen	111

1 Einleitung

In der Plazenta des Rindes werden bereits ab dem 3.-4. Graviditätsmonat große Mengen an Östrogenen gebildet (Robertson und King, 1979). Dabei handelt es sich vorwiegend um am klassischen Östrogenrezeptor inaktive konjugierte Östrogene, vor allem Estron-sulfat. Erst in den letzten 20-30 Tagen ante partum und besonders in den letzten sieben Tagen der Gravidität werden vermehrt freie Östrogene wie Estron und Estradiol-17 β im peripheren Blut des Rindes nachgewiesen (Möstl et al., 1981; Hoffmann et al., 1976; Hoffmann et al., 1979; Hoffmann et al., 1997). Der Verlauf der Östrogenkonzentrationen im peripheren Blut des Rindes sowie ihre Biosynthese in der Plazenta waren Gegenstand intensiver Forschungen (Peterson et al., 1975; Hoffmann et al., 1991; Schuler et al., 1994; Hoffmann et al., 1997). Über Wirkungsort und Funktion der gebildeten Östrogene ist jedoch wenig bekannt.

Die Östrogensulfotransferase ist für die Sulfokonjugation von Östrogenen verantwortlich, wohingegen die Steroidsulfatase sulfokonjugierte Östrogene hydrolysieren und damit in die am klassischen Östrogenrezeptor wirksame freie Form überführen kann (Mattioli et al., 1984; Möstl et al., 1986). Bei in vitro Versuchen zur Östrogenbiosynthese in der Plazenta des Rindes wurden aus Androstendion, Dehydroepiandrosteron sowie Pregnenolon bisher als Umwandlungsprodukte in erster Linie freie Östrogene nachgewiesen (Schmitt, 1994; Schuler, 1994; Adiani, 1995). In vivo dagegen werden im maternalen Blut vor allem konjugierte Östrogene gefunden (Hoffmann et al., 1997).

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen diesen Widerspruch zwischen den in vivo und in vitro Ergebnissen aufzuklären. Zum anderen sollte ein Aktivitätsprofil der Östrogensulfotransferase und der Steroidsulfatase über den Verlauf der zweiten Graviditätshälfte erstellt werden. Ferner sollten die Untersuchungen Aufschluß über die subzelluläre Lokalisation dieser beiden placentaren Enzyme beim Rind geben. Die hierbei gewonnenen Informationen sollten dazu beitragen, die Produktionsstätte(n) konjugierter Östrogene während der Gravidität des Rindes zu lokalisieren, mögliche Zielzellen anhand einer Sulfataseaktivität zu identifizieren und dadurch die biologische Bedeutung konjugierter Östrogene aufzuklären. Die begleitenden Untersuchungen sollten zum einen das Myometrium als mögliches Zielgewebe auf seine Fähigkeit zur Hydrolyse von Östrogensulfaten untersuchen und zum anderen die Aktivität von Östrogensulfotransferase und Steroidsulfatase in den steroidogenen Organen Plazenta, Corpus luteum graviditatis und

Corpus luteum cyclicum vergleichen.

2 Literaturübersicht

2.1 Östrogene im maternalen und fetalen Blutkreislauf während der Trächtigkeit

Während der Trächtigkeit werden sowohl im maternalen als auch im fetalen Kompartiment vor allem konjugierte Östrogene nachgewiesen. Freie Östrogene findet man dagegen nur in 10-100fach geringerer Konzentration (Hoffmann et al., 1976, 1997). Im peripheren maternalen Plasma ist Estronsulfat das Hauptöstrogen (62%), gefolgt von konjugiertem Estradiol-17 α (37%), wohingegen im Plasma der Nabelvene des Fetus konjugiertes Estradiol-17 α das Hauptöstrogen darstellt, Estradiol-17 β -Sulfat wird sowohl im maternalen als auch im fetalen Kompartiment in den geringsten Konzentrationen nachgewiesen (1%) (Hoffmann et al., 1976, 1997). Ein erster Anstieg von freiem und sulfokonjugiertem Estron im peripheren maternalen Plasma erfolgt bereits zwischen dem 110. und 120. Tag der Gravidität (Hoffmann et al., 1997). Zwischen Tag 230 und 250 der Trächtigkeit beginnt der Estronsulfatspiegel im peripheren Plasma des Rindes weiter erheblich anzusteigen, um erst post partum nach Abgang der Secundinae wieder auf Basalniveau abzufallen (Hoffmann et al., 1979, 1997). Die höchsten Werte für Estron und Estronsulfat wurden zwei Tage ante partum gemessen; sie lagen im Mittel bei 8 nmol/l bzw 20 nmol/l (Hoffmann et al., 1997). Parallel dazu steigen auch die freien Östrogene unmittelbar ante partum stark an (Möstl et al., 1981; Hoffmann et al., 1997). Auch konjugiertes Estradiol-17 α und konjugiertes Estradiol-17 β sind bereits ab dem 100. bzw. 160. Tag der Gravidität im peripheren Blut nachweisbar, wohingegen freies Estradiol-17 α und freies Estradiol-17 β erst zehn Tage ante partum zu finden sind (Hoffmann et al., 1997). Der Östrogengehalt des maternalen peripheren Plasmas des Rindes ist vom Geschlecht des Fetus' unabhängig (Robertson und King, 1979).

Estron liegt im Plasma v.a. in sulfokonjugierter Form vor, wogegen Estradiol-17 α und Estradiol-17 β in erster Linie in glucuronidierter Form gefunden werden. Im Kot wird vor allem freies Estradiol-17 α , gefolgt von freiem Estradiol-17 β und geringen Mengen freien Estrons gefunden. Im Harn wurden in erster Linie Estronsulfat, gefolgt von Estradiol-17 α -Glucuronid und Estradiol-17 β -Glucuronid nachgewiesen (Hoffmann et al., 1997).

2.2 Herkunft und Bildung der graviditätsspezifischen Östrogene

Die während der Gravidität des Rindes auftretenden Östrogene stammen vor allem aus dem fetalen Teil der Plazenta (Hoffmann et al., 1979; Hoffmann, 1983; Mattioli et al., 1984). Früher wurden die binucleären Zellen des fetalen Trophoblasten der Rinderplazenta als Hauptsyntheseort angesehen (Gross und Williams, 1988). Matamoros et al. (1994) zeigten jedoch, daß sowohl die mononucleären als auch die binucleären Zellen des fetalen Trophoblasten zur Östrogenbiosynthese befähigt sind. Estron, das Hauptöstrogen der Plazenta, wird jedoch vermehrt in den uninucleären Trophoblastzellen gebildet, in denen auch das P450 cholesterol side-chain cleavage Enzym (P450_{scc}) in den Mitochondrien zu finden ist (Ben-David und Shemesh, 1990). Die plazentare Progsteronsynthese findet nach Reimers et al. (1985) dagegen bevorzugt in den binucleären Trophoblastzellen statt. Zahlreiche Arbeiten befassen sich mit der Biosynthese plazentarer Östrogene beim Rind (Evans und Wagner, 1981, Larson et al., 1981, Hoffmann, 1983; Möstl et al., 1987, Gross und Williams, 1988, Hoedemaker et al., 1990; Hoffmann et al., 1991). Nach Schuler et al. (1994) werden die plazentaren Östrogene fast ausschließlich über den Δ^5 -Syntheseweg synthetisiert. Das durch das P450_{scc} aus Cholesterin gebildete Pregnenolon wird durch Cytochrom P450c 17 α über 17 α -Hydroxypregnenolon zu Dehydroepiandrosteron transformiert. Die hohe Aktivität der 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase/ $\Delta_{4/5}$ -isomerase führt zur Umwandlung in Androstendion, welches dann durch die Cytochrom P450-Aromatase zu Estron umgewandelt wird. Gegen Ende der Gravidität wurde eine vermehrte Synthese von Estron aus Pregnenolon beobachtet, da dann die Aktivität von Cytochrom P450c 17 α durch Cortisol aus der fetalen Nebennierenrinde gesteigert wird (Flint et al., 1979; Thorburn, 1991). Der Δ^4 -Syntheseweg endet in der Plazenta des Rindes auf der Stufe des 17 α -Hydroxyprogesterons, welches von der Cytochrom P450c 17 α (17 α -Hydroxylase-C17, 20-Lyase) nicht weiter umgesetzt wird (Schuler et al., 1994).

2.3 Wirkungsweisen von Östrogenen

Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften können Östrogene ungehindert Zellmembranen passieren. Eine klassische Wirkung tritt dann ein, wenn diese Zellen mit als Östrogenrezeptoren bezeichneten Bindungsproteinen ausgestattet sind. Neben dem klassischen

Weg können Östrogene aber auch nicht genomisch entweder über die Aktivierung membranständiger Rezeptoren (Pappas et al., 1995; Farhat et al., 1996) oder auch rezeptorunabhängig Wirkungen entfalten.

2.3.1 Genomische Östrogenwirkung

Das erstmals von Jensen und Jacobson (1962) und später von Tchernitchin et al. (1974) und Duval et al. (1983) beschriebene Konzept der Bindung an einen cytoplasmatischen Rezeptor mit anschließender Translokation des Östrogen-Rezeptorkomplexes in den Zellkern wurde dahingehend modifiziert, daß die Bindung vorzugsweise an den klassischen Östrogenrezeptor vor allem im Kern erfolgt (Gronemeyer, 1992). Lediglich freie, nicht konjugierte Östrogene werden gebunden. Im Zellkern bindet der Östrogen-Rezeptorkomplex an spezielle Chromatinstellen und löst so die Transkription von mRNA aus. Diese mRNA codiert wiederum die Synthese spezifischer Proteine und Enzyme, die für die genomische Östrogenwirkung verantwortlich sind (Tchernitchin et al., 1974; Duval et al., 1983). Die biologische Wirksamkeit der Östrogene hängt dabei u.a. von ihrer Bindungsfähigkeit an den Östrogenrezeptor sowie der Verweildauer des Östrogen-Rezeptorkomplexes im Zellkern ab (Jungblut et al., 1979). Die Verweildauer ist bei den verschiedenen Östrogenen sehr unterschiedlich. So liegt die Halbwertszeit des Estradiol-17 β -Rezeptorkomplexes im Kern bei 90 min, während die Halbwertszeit des Estron-Rezeptorkomplexes nur bei 20 min liegt, so daß keine optimale genomische Wirkung entfaltet werden kann (Jungblut et al., 1979). Estradiol-17 β ist daher biologisch wirksamer als Estron und Estradiol-17 α (Bamberg, 1994a). In Abhängigkeit von der Konzentration können schwächer bindende mit stärker bindenden Östrogenen um Rezeptorbindungsstellen konkurrieren. In solchen Situationen treten keine additiven sondern antagonistische, sogenannte antiöstrogene Effekte auf (Sasson und Notides, 1983).

2.3.2 Nicht-genomische Östrogenwirkung

Es wurden Östrogenwirkungen beobachtet, die für eine genomische Wirkung zu rasch und von der Proteinbiosynthese unabhängig erfolgten. Bereits 5 Minuten nach Estradiolgabe konnten im Rattenuterus eine Einwanderung eosinophiler Granulozyten, eine

gesteigerte Gefäßpermeabilität, eine Hyperämisierung und Ödembildung sowie eine Histaminfreisetzung beobachtet werden (Szego, 1965; Tchernitchin, 1973; Tchernitchin, 1979). Endometriumszellen zeigten sogar schon 30 Sekunden nach Estradiol-17 β -Gabe eine drastische Umorganisation von Mikrovilli und Mikrotubuli (Szego et al., 1988). Ferner erfolgte die Freisetzung von Prostaglandin F aus glandulären Zellen des sekretorischen Endometriums unabhängig von der Proteinneusynthese (Smith und Kelly, 1987).

Eine nicht genomische Östrogenwirkung kann auf zwei Arten erfolgen: über Rezeptoren ohne Translokation in den Zellkern und der damit verbundenen Proteinsynthese oder rezeptorunabhängig.

2.3.2.1 Nicht-genomische rezeptorabhängige Östrogenwirkungen

Es wurden membranständige Östrogenrezeptoren in verschiedenen Geweben nachgewiesen (Pappas et al., 1995; Farhat et al., 1996), welche strukturell dem intrazellulären Östrogenrezeptor ähneln (Karthikeyan und Thampan, 1996). Auch in den mikrosomalen Membranen des Rinderuterus wurden hochaffine Östrogenbindungsstellen gefunden (Parikh et al., 1980). Membranständige Östrogenrezeptoren blockieren nach Aktivierung durch Östrogene vermutlich die Ca⁺⁺-Ionenkanäle und führen so zum Beispiel zur Vasodilatation oder hemmen die Verfügbarkeit extrazellulären Kalziums in Uterusmuskulzellen von Mensch und Ratte und senken damit die Erregbarkeit dieser glatten Muskulzellen (Pietras und Szego, 1975; Batra, 1986; Yamamoto, 1995; Farhat et al., 1996; Wehling, 1997).

Membranständige Rezeptoren wurden auch auf eosinophilen Granulozyten und auf Uteruskapillaren der Ratte nachgewiesen, ferner wurden auch östrogenspezifische Rezeptoren im Cytosol von eosinophilen Granulozyten der Ratte gefunden (Tchernitchin und Tchernitchin, 1976; Tchernitchin, 1979). Die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt die Einwanderung eosinophiler Granulozyten bzw. die Ödematisierung des Rattenuterus. Diese membranständigen Steroidrezeptoren wurden bisher noch nicht genauer charakterisiert.

Eine andere nicht genomische rezeptorabhängige Steroidwirkung ist für Neurosteroiden bekannt. Gestagene können die GABA-Wirkung modulieren, da der GABA- α -Rezeptor eine Steroidbindungsstelle besitzt (Gee et al., 1995).

2.3.2.2 Nicht-genomische rezeptorunabhängige Östrogenwirkungen

Auch hydroxylierte Östrogene, die kaum an den Östrogenrezeptor binden, haben biologische Wirkungen (Hohls, 1991). Östrogene können enzymatische Aktivitäten in isolierten Membranen verändern und die Aktivität gereinigter Enzyme beeinflussen; so steigern Östrogene z.B. in der glatten Muskulatur von Gefäßen und Uterus den cAMP-Gehalt (Aronica und Katzenellenbogen, 1993; Farhat et al., 1996). Dies geschieht wahrscheinlich durch die Aktivierung der membrangebundenen Adenylatcyclase. Im Östrus der Ratte werden Östrogene in die Plasmamembran des Vaginalepithels eingelagert und verändern dadurch die Membranfluidität (Reddy et al., 1989), weiterhin beeinflussen Östrogene Ionenkanäle (Pietras und Szego, 1975) und verändern so die Zellpermeabilität und Polarisation der Plasmamembran (Weiss und Gurpide, 1988).

2.4 Biologische Bedeutung der plazentaren Östrogenproduktion

Die biologische Funktion der während der Gravidität des Rindes gebildeten großen Mengen an sulfokonjugierten Östrogenen ist bisher weitgehend unbekannt. Durch die Sulfokonjugation verlieren die Östrogene die Fähigkeit, an den klassischen Östrogenrezeptor zu binden und gehen in eine wasserlösliche, besser an Albumin bindende Transportform über (Rosenthal et al., 1975; Bhavnani, 1998). Die wasserlöslichen Sulfokonjugate haben an Albumin gebunden im Blut eine längere Verweildauer und werden dadurch weniger langsamer ausgeschieden als freie Östrogene (Bhavnani, 1998). Durch Hydrolyse (siehe Abschnitte 2.5.2) können sie prinzipiell an jeder Stelle des Organismus wieder aktiviert werden. Der Wirkungsort der plazentaren Östrogene ist noch unbekannt, er könnte in der Plazenta selbst oder auch in der Peripherie liegen. Möglich ist auch, daß diese Östrogene keine Funktion haben sondern ein Relikt aus der Evolution sind, wobei die sulfokonjugierte Form inaktiv ist und somit keine unerwünschten Wirkungen hat. Aber auch nicht genomische regulative Wirkungen auf die Progesteronrezeptorsynthese und damit indirekt auf die Sulfokonjugation von Östrogenen sind denkbar (vergl. Abschnitt 2.5.1.1).

2.4.1 Bedeutung im Verlauf der Trächtigkeit

Eine befriedigende funktionelle Zuordnung der während der Gravidität des Rindes in zunehmendem Maß gebildeten Östrogenmengen kann derzeit nicht gegeben werden. Bisher vorliegende Informationen zur Bedeutung plazentarer Östrogene stammen in erster Linie von Menschen, Primaten und Nagern. Generell kann davon ausgegangen werden, daß die biologisch aktiven Östrogene das Wachstum von Uterus und Plazenta sowie eine ausreichende Ernährung des Fetus ermöglichen (Resnik et al., 1975; Penney et al., 1981; Pasqualini et al., 1982; Lubahn et al., 1993; Pepe und Albrecht, 1995), indem sie die Durchblutung von Uterus (Greiss und Anderson, 1970; Resnik et al., 1974; Rosenfeld et al., 1976) und Plazenta (Helmer und Judson, 1967; Magness et al., 1993) sowie die Proteinsynthese (Challis und Lye, 1994) steigern und die Produktion von Wachstumsfaktoren, wie dem Colony Stimulating Factor-1 in Uterus und Plazenta des Menschen (Daiter et al., 1992) und dem Polypeptide Growth Factor im Uterus von Ratte und Maus (Pollard, 1990), fördern. Außerdem sind Östrogene bei Ratten und Mäusen indirekt über die Steigerung der Anzahl der Progesteronrezeptoren für die lobuloalveoläre Entwicklung (Imagawa et al., 1985; Imagawa et al., 1994) sowie die DNA-Synthese in den Drüsenalveolen der Mamma wichtig (Bresciani, 1968). Auch bei der Lungenreifung und der Entwicklung des Fetus sind Östrogene bei Mensch und Kaninchen von Bedeutung, indem Estradiol 17β die Produktion des fetalen Lungenantiatelektasefaktors und die Phosphatidylcholinsynthese steigert (Conly et al., 1973; Khosla und Rooney, 1979; Khosla et al., 1980; Khosla et al., 1981). Bei Mensch (Albrecht und Pepe, 1990), Pavianen (Albrecht, 1980; Albrecht und Pepe, 1984; Albrecht et al., 1991), Kaninchen (Keyes und Nalbandov, 1967; Holt, 1989; Keyes et al., 1990) und Ratten (Gibori et al., 1984) ist die Stimulation der plazentaren Progesteronsynthese durch Östrogene nachgewiesen worden. Durch die Stimulation der Progesteronsynthese sind Östrogene indirekt an der Wehenhemmung und über die progesteronbedingte lokale Immunsuppression auch an der Implantation und Entwicklung des Embryos beteiligt (Pepe und Albrecht, 1995).

Bei Mensch und Pavian reguliert plazentares Östradiol die Verfügbarkeit maternalen Cortisols dahingehend, daß während der 2. Hälfte der Gravidität durch die plazentaren Östrogene vermehrt biologisch aktives Cortisol für die Reifung cortisolabhängiger fetaler Organe bereitsteht, wohingegen direkt ante partum die Oxidation von maternalem

Cortisol zu biologisch inaktivem Cortison dominiert (Pepe et al., 1988; Pepe und Albrecht, 1995).

2.4.2 Bedeutung unmittelbar ante partum

Das praepartale Absinken des Progesteronspiegels ist bei vielen Säugetierarten, Ausnahmen sind z.B. Hund, Katze und Pferd, mit einem Anstieg des peripheren Östrogenspiegels verbunden (Huszar und Roberts, 1982). Eine mögliche Bedeutung des zusätzlichen, peripartalen Östrogenanstieges wird bei der Ratte in der Geburtseinleitung gesehen, Estradiol-17 β aktiviert die Östrogenrezeptoren, wodurch die Synthese von Oxytocinrezeptoren stimuliert wird (Alexandrova und Soloff, 1980). Auch bei der Ziege läßt sich durch Estradiol-17 β -Gaben die Geburt auslösen (Currie et al., 1976).

Allerdings scheinen Östrogene bei der Geburt des Rindes mehr eine ermöglichende als einen initiiierende Rolle zu spielen (Evans und Wagner, 1976; Fairclough et al., 1992). Die ermöglichende Östrogenwirkung kann auf verschiedenen Wegen zustande kommen. Estradiol-17 β induziert im Rattenuterus die Bildung von Oxytocinrezeptoren, erhöht so die Ansprechbarkeit des Uterus auf Oxytocin, und ermöglicht damit das Einsetzen der Wehen (Alexandrova und Soloff, 1980; Fuchs et al., 1983). Garfield et al. (1980) beobachteten nach Estradiol-17 β -Gaben weniger häufige, aber dafür stärkere Kontraktionen des Rattenuterus. Ferner fördert Estradiol-17 β die Bildung von gap junctions und somit die Kommunikation zwischen den Uteruszellen (Wathes und Porter, 1982). Weiterhin sind Östrogene beim Menschen zumindest teilweise an der Regulation der Oxytocinsynthese beteiligt, so daß sie parakrin an der Regulation der Geburtsinduktion mitwirken (Chibbar et al., 1995). Außerdem wird die Synthese von Prostaglandin F_{2 α} im Uterus von Ratte und Meerschweinchen durch Östrogene stimuliert (Naylor und Poyser, 1975; Kelly und Abel, 1980). Sowohl Oxytocin als auch Prostaglandin F_{2 α} heben den intrazellulären Ca⁺⁺-Spiegel und erhöhen damit die Kontraktilität des Uterus (Naylor und Poyser, 1975).

Beim Rind gibt es eine hohe positive Korrelation zwischen einem hohen Östrogenanstieg ante partum und einem zeitgerechten Abgang der Secundinae (Agthe und Kolm, 1975; Grunert et al., 1989), vor allem Estradiol-17 β wird ante partum in höheren Konzentrationen im peripheren Blut nachgewiesen (Chew et al., 1977). Wahrscheinlich ist der hohe Östrogenspiegel jedoch nicht ursächlich verantwortlich für den Abgang der

Secundinae, er ist vielmehr ein Indikator für eine „reife“ Plazenta.

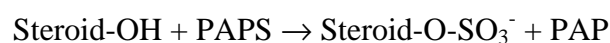
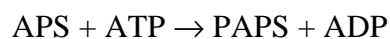
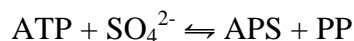
Es erscheint unwahrscheinlich, daß die Plazenta selbst das Zielorgan der ante partum vermehrt gebildeten freien Östrogene ist, da zum Zeitpunkt der Geburt in der bovinen Plazenta im maternalen Kompartiment sehr geringe Mengen, im fetalen Teil der Plazentome keine klassischen Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden konnten (Sauerwein et al., 1989).

2.5 Regulation der Aktivität von plazentaren Östrogenen

Biologisch wenig aktives Östrogensulfat wird durch die Steroidsulfatase hydrolysiert und damit aktiviert. Umgekehrt werden freie Östrogene durch die Östrogensulfotransferase sulfokonjugiert und damit in eine wasserlösliche Transport- oder Ausscheidungsform überführt. Die meisten Untersuchungen zu diesen beiden Enzymen wurden beim Menschen durchgeführt.

2.5.1 Östrogensulfotransferase

Die Östrogensulfotransferase (beim Menschen E.C.2.8.2.2.) sulfoniert die Östrogene an ihrer C3-ständigen OH-Gruppe, indem sie an das Sauerstoffatom des Steroids die Sulfatgruppe von 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) bindet (Kuss, 1994). Dieses "aktive" Sulfat wird synthetisiert, indem zuerst Adenosintriphosphat (ATP) und Sulfat zu Adenosin-5-phosphosulfat (APS) und Pyrophosphat (PP) umgesetzt werden, worauf das entstandene Adenosin-5-phosphosulfat mit einem weiteren Adenosintriphosphat zu 3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat und Adenosindiphosphat (ADP) reagieren (Holcenberg und Rosen, 1965; Bernier et al., 1994a).



In der Literatur wird diese Sulfonierung meist chemisch unkorrekt als Sulfatierung bezeichnet. Da sich dieser Begriff allgemein etabliert hat, wird im Folgenden ebenfalls von Sulfatierung gesprochen.

2.5.1.1 Expression der Östrogensulfotransferase

Vorkommen und Exprimierung der Östrogensulfotransferase in verschiedenen Geweben sind je nach Spezies, Geschlecht, Alter, Entwicklung und physiologischem Zustand sehr unterschiedlich (Strott, 1996).

Im humanen und porcinen Uterus wurde nachgewiesen, daß Östrogene die Synthese von Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren stimulieren und über einen negativen Regelkreis in der Lage sind, ihre Wirkung zu limitieren: Estradiol-17 β induziert die Bildung von Östrogenrezeptoren (Saunders et al., 1989). Bindet nun Estradiol-17 β an den Östrogenrezeptor, wird die Transkription des Progesteronrezeptorgenes induziert (Leavitt et al., 1978). Durch Bindung von Progesteron an seinen Rezeptor wird eine gesteigerte Synthese der Östrogensulfotransferase ausgelöst (Pewnim et al., 1980; Tseng und Liu, 1981; Clarke et al., 1982b; Meyers et al., 1983; Falany und Falany, 1996). Die Östrogensulfotransferase sulfatiert einerseits das freie Estradiol-17 β und inaktiviert es, andererseits kommt es hierdurch zum Entzug des Stimulus für die Östrogenrezeptor-expression (Saunders et al., 1989).

Zusätzlich hemmt Estradiol-17 β - wie auch Progesteron - die Aktivität der Steroidsulfatase des Menschen (Townsend, 1973); so fördert Estradiol-17 β seine eigene Sulfo-konjugation und hemmt gleichzeitig die Bildung von weiteren freien Östrogenen.

2.5.1.2 Östrogensulfotransferase in der Plazenta des Menschen

Bisher wurden fünf cytosolische Sulfotransferasen beim Menschen nachgewiesen, welche eine feste aber überlappende Substratspezifität aufweisen (Her et al., 1996; Falany, 1997). Während Hobkirk (1985) davon ausging, daß in der humanen Plazenta im Gegensatz zum Fetus (Diczfalusy, 1969; Hondoh et al., 1994) und zum Endometrium (Tseng und Liu, 1981; Clarke et al., 1982b; Grosso und Way, 1984; Hata et al., 1987) keine Östrogensulfotransferase exprimiert wird, gelang Tseng et al. (1985) die Darstellung einer cytosolischen Östrogensulfotransferase in der Geburtsplazenta des Menschen. Der Nachweis dieses Enzymes wurde durch die hohe Aktivität der placentaren Steroidsulfatase erschwert. Die placentare Östrogensulfotransferase des Menschen ist weitgehend östrogenspezifisch (Tseng et al., 1985; Bernier et al., 1994b). Das Substrat mit der

höchsten Affinität ist Estradiol ($K_m = 4 \mu\text{M}$), gefolgt von Estron ($K_m = 20 \mu\text{M}$); in deutlich geringeren Mengen konnte auch eine Sulfatierung von Estriol, Dehydroepiandrosteron und Androsteron beobachtet werden (Tseng et al., 1985). Der isoelektrische Punkt der placentaren Östrogensulfotransferase liegt bei pH 5,8 (Tseng et al., 1985). Ihr Molekulargewicht wird unterschiedlich angegeben: Während Tseng et al. (1985) nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Präzipitation und anschließender Agarosegel-Chromatographie ein Enzym mit 68 kDa isolierten, errechneten Bernier et al. (1994b) nach der Analyse der cDNA ein Molekulargewicht von 34 kDa. Die Östrogensulfotransferase in der Plazenta des Menschen weist in der Aminosäuresequenz eine 68,6 %ige Übereinstimmung mit der placentaren Östrogensulfotransferase des Rindes auf (Bernier et al., 1994b).

2.5.1.3 Die Östrogensulfotransferase bei anderen Säugetieren

Angaben zur Östrogensulfotransferase finden sich auch für das Rind, die Maus, Ratte, Meerschweinchen, Schwein und Schaf.

Enzymparameter: Die Molekulargewichte der einzelnen Östrogensulfotransferasen sind zum Teil ähnlich. So wurde für die Östrogensulfotransferase der Maus ein Molekulargewicht von 30 kDa (Hobkirk et al., 1983; Hobkirk et al., 1985), für die des Schweines ein Molekulargewicht von 31 kDa (Brooks et al., 1987) und für die des Meerschweinchens ein Molekulargewicht von 34 kDa (Lee et al., 1990) beschrieben. In der Leber der Ratte wurde eine Östrogensulfotransferase mit einem Molekulargewicht von 54,5 kDa gefunden (Green und Singer, 1983).

Neben unterschiedlichen Molekulargewichten wurden auch verschiedene Michaelis-Mentens-Konstanten (K_m) gefunden. Brooks et al. (1987) beschrieben für die Östrogensulfotransferase aus dem porcinen Uterus einen K_m -Wert von 24 nM, im murinen Uterus und Plazenta besitzt die Östrogensulfotransferase für Estron und Estradiol einen identischen K_m -Wert von 50 nM (Hobkirk et al., 1983; Hobkirk et al., 1985). Für die Östrogensulfotransferase aus Uterus und Chorion des Meerschweinchens geben Freeman et al. (1983) einen K_m -Wert für Estron und Estradiol-17 β von 100 nM an. Hobkirk (1996) berichtet, daß im gereinigten Cytosol aus dem Chorion von Meerschweinchen gegen Ende der Gravidität Estradiol um ein zweifaches schneller sulfatiert wird als

Estron, während der restlichen Gravidität und im Uterus konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden. In Ovar-K1 Zellen des Chinesischen Hamsters wurde nach Transfektion mit Meerschweinchen Nebennieren Östrogensulfotransferase-cDNA (OK1CH+cDNA) eine Östrogensulfotransferase mit einem Km-Wert für Estron von 60 nM, für Estradiol-17 β von 70 nM und für Estriol von 40 nM beschrieben (Tomizuka et al., 1994).

Eine wellenförmige Kinetik wie beim Rind (Adams und Low, 1974; Adams et al., 1974) wurde bei anderen Tierarten nicht beschrieben, vielmehr weisen die Östrogensulfotransferasen aus Uterus und Chorion des Meerschweinchens (Freeman et al., 1983) sowie die Östrogensulfotransferase aus OK1CH+cDNA-Zellen (Tomizuka et al., 1994) eine Michaelis-Menten-Kinetik auf.

Bei Rind (Nash et al., 1988), Ratte (Demyan et al., 1992), Meerschweinchen (Oeda et al., 1992), Maus (Song et al., 1995) und Mensch (Aksoy et al., 1994) wurde die cDNA der Östrogensulfotransferase geklont und untersucht.

Bei Vergleichen der Aminosäuresequenzen wurden folgende Homologien festgestellt (Strott, 1996): Am homologsten sind die Östrogensulfotransferasen von Maus und Ratte, die zu 88 Prozent übereinstimmen, wohingegen die geringste Homologie zwischen Ratte und Rind (66%) gefunden wurde; die Übereinstimmung der bovinen Östrogensulfotransferase mit der der Maus liegt bei 68%, die Homologie zwischen Rind und Mensch bei 73% und bei 70% zwischen Meerschweinchen und Mensch.

Die Östrogensulfotransferase des Meerschweinchens weist eine hohe Substratspezifität für Estron und Estradiol auf (Hobkirk et al., 1990). Die uterine und plazentare Östrogensulfotransferase der Maus sulfatieren in hohem Maße Estron und Estradiol, Estriol wird kaum sulfokonjugiert (Hobkirk et al., 1983). Testosteron, Cortison und Dehydroepiandrosteron sind keine Substrate der murinen Östrogensulfotransferase (Hobkirk et al., 1983). Die Östrogensulfotransferase der Rattenleber ist spezifisch für die 3-Position von Estradiol, sie sulfatiert kein Estron, sie hat einen Km-Wert von 80 μ M für Estradiol (Green und Singer, 1983).

Beim Rind (Moore et al., 1988) und Meerschweinchen (Lee et al., 1990) wurden verschiedene Isoformen der Östrogensulfotransferase mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten gefunden. Lee et al. (1990) beschrieben 4 Isoformen für die Östrogensulfotransferase aus der Nebenniere des Meerschweinchens und Tomizuka et al. (1994) fanden mehrere Isoformen in OK1CH+cDNA-Zellen.

Exprimierung der Östrogensulfotransferase: Da prinzipiell auch einige Phenolsulfotransferasen in der Lage sind Östrogene zu sulfokonjugieren (Bernier et al., 1994b; Ozawa et al., 1993), sind die folgenden Angaben über Nachweise einer Sulfatierung von Östrogenen in verschiedenen Geweben allerdings nicht zwingend auf ein Vorhandensein der Östrogensulfotransferase zurückzuführen.

Beim Meerschweinchen wurde eine hohe Östrogensulfotransferaseaktivität sowohl in der männlichen als auch in der weiblichen Nebenniere (Hobkirk und Glasier, 1992), im Uterus (Hobkirk, 1996) und im Chorion (Bartlett und Hobkirk, 1991) gefunden, wohingegen in Ovar und Hoden (Hobkirk et al., 1990; Hobkirk und Glasier, 1992) nur eine geringe Aktivität nachgewiesen wurde. In der Nebenniere wurde zusätzlich zum Cytosol auch im Zellkern eine Östrogensulfotransferaseaktivität festgestellt (Hobkirk et al., 1990; Whitnall et al., 1993). Im Chorion des Meerschweinchens ist während der ersten Graviditätshälfte ein Anstieg der Östrogensulfotransferaseaktivität zu beobachten, anschließend sinkt sie zur Geburt hin in den Bereich der unteren Nachweisgrenze ab (Bartlett und Hobkirk, 1991).

Bei der Maus findet man im Gegensatz zum Meerschweinchen im Hoden eine hohe und in der Nebenniere eine geringe Östrogensulfotransferaseaktivität (Hobkirk und Glasier, 1992). In der murinen Plazenta steigt die Östrogensulfotransferaseaktivität ab dem 12. Graviditätstag bis zur Geburt an, um post partum rasch abzusinken (Hobkirk et al., 1983). Ab dem 16. Tag der Trächtigkeit ist auch in der Decidua basalis des Uterus eine Steigerung der Östrogensulfotransferaseaktivität zu beobachten (Hobkirk et al., 1983).

Für die Ratte sind geschlechtsspezifische Unterschiede in der Exprimierung der Östrogensulfotransferase bekannt; so wird bei geschlechtsreifen Männchen in der Leber eine Östrogensulfotransferaseaktivität gefunden, wohingegen die Weibchen in der Leber physiologischerweise keine Östrogensulfotransferase exprimieren (Demyan et al., 1992; Mancini et al., 1992; Borthwick et al., 1993). Zusätzlich wurde auch im Hodengewebe geschlechtsreifer Ratten und in der Nebenniere eine Östrogensulfotransferaseaktivität nachgewiesen (Payne, 1980). Im weibliche Geschlechtstrakt der Ratte fand sich kaum eine Östrogensulfotransferaseaktivität (Hobkirk et al., 1983).

Beim Schwein wurde die Östrogensulfotransferase im Endometrium nachgewiesen (Meyers et al., 1983; Saunders et al., 1989). Bei nicht graviden Tieren wird sie - ähnlich wie beim Menschen (Pack et al., 1979; Buirchell et Hähnel, 1975) - im Uterus cyclisch

exprimiert (Pack et Brooks, 1995). Im Endometrium der graviden Sau ist die Östrogensulfotransferaseaktivität während des ersten Drittels der Trächtigkeit hoch, sinkt nach dem 30. Trächtigkeitstag bis zum 60. Tag der Gravidität ab, um dann bis zum 90. Tag konstant zu bleiben (Dwyer und Robertson, 1980).

Beim Schaf wurde eine hohe Östrogensulfotransferaseaktivität in der fetalen Plazenta gefunden (Rosenfeld et al., 1980), im Myometrium dagegen nur eine geringe (Rossier und Pierrepont, 1974). Im Endometrium des Schafes ist vor dem 16. Tag der Gravidität, wie auch beim nicht graviden Uterus, nur eine sehr geringe Aktivität nachweisbar, die ab dem 20. Trächtigkeitstag ansteigt (Dwyer und Robertson, 1980). Auch im Nierenmark von fetalen und adulten Schafen wurde eine Östrogensulfotransferaseaktivität nachgewiesen (Hobkirk und Cardy, 1985).

Beim Menschen wurde eine Östrogensulfotransferase außer in der Plazenta (siehe Abschnitt 2.5.1.2) noch im physiologischen und carcinomatös entarteten Mammagewebe nachgewiesen (Anderson und Howell, 1995). Beim humanen Fetus wird in vielen Geweben eine Östrogensulfotransferaseaktivität gefunden: so in Nebenniere, Leber Niere, Thymus, Haut, Lunge, Muskulatur (Wengle, 1966; Her et al., 1996) und Gehirn (Davidson et al., 1983).

2.5.1.4 Östrogensulfotransferase beim Rind

Über die Substratspezifität der Östrogensulfotransferase gibt es widersprüchliche Untersuchungsergebnisse. Einmal wird sie als hoch spezifisch für die 3-Hydroxy-Gruppe der Östrogene eingestuft, weil keine Sulfatierung neutraler Steroide mit einer OH-Gruppe am C3-Atom, wie z.B. von Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon und Corticosteron, beobachtet werden konnte (Adams und Low, 1974). Bei Holcenberg und Rosen (1965) wird in einem in vitro Versuch mit Cytosol jedoch die Sulfatierung von 4-Nitrophenol, Estron und Dehydroepiandrosteron in absteigender Affinität in der Rinderplazenta beschrieben. Auch über das Molekulargewicht der Östrogensulfotransferase gibt es stark abweichende Angaben. Adams (1991) berichtet von einem Dimer aus zwei identischen Untereinheiten, welches ein Molekulargewicht von 74 kDa hat, in zwei bis drei polymorphen Formen existieren kann und eine wellenförmige Kinetik aufweist (Adams und Low, 1974; Adams et al., 1974). Clarke et al. (1982a) isolierten bei der Gelelektrophorese von Östrogensulfotransferase neben der 74 kDa Bande noch weitere Banden bei

12 kDa, 24 kDa und 36 kDa, welche die Fähigkeit besaßen, sich zu einem Komplex von 70 kDa zu verbinden. Nash et al. (1988) berichteten nach Clonierung der Östrogensulfotransferase-cDNA über ein maximales Molekulargewicht von 34,6 kDa. Moore et al. (1988) beschreibt 2 verschiedene Isoformen der Östrogensulfotransferase, die sich in ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden. Übereinstimmend wird die Östrogensulfotransferaseaktivität in der Plazenta des Rindes vor allem in den Kotyledonen gefunden (Mattioli et al., 1984; Möstl et al., 1986).

2.5.2 Steroidsulfatase

2.5.2.1 Die Sulfatase in der Plazenta des Menschen

Die placentare Steroidsulfatase des Menschen dient vorwiegend der Hydrolyse von Präkursoren für die Östrogenbiosynthese (Diczfalusy, 1969; Dibbelt und Kuss, 1984). Wegen ihrer Bedeutung im Rahmen der Früherkennung der X-Chromosom abhängigen Ichthyosis ist die Sulfataseaktivität in der Plazenta des Menschen wesentlich besser untersucht als die Sulfataseaktivität bei anderen Spezies.

Die Plazenta des Menschen ist in der Lage sowohl Sterylsulfate als auch Arylsulfate zu hydrolysieren. In absteigender Reihenfolge können nicht steroidale Phenole, phenolische Steroide sowie neutrale 3 β -, 21-, und 17 β -Hydroxysteroiden hydrolysiert werden (Dibbelt und Kuss, 1991). Die Sulfataseaktivität in den Mikrosomen der Plazenta bleibt während der Schwangerschaft konstant (Leslie et al., 1994). Die Steroidsulfatase initiiert durch die Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat die Östrogenbiosynthese, wobei zum Zeitpunkt der Geburt etwa 90% des Dehydroepiandrosteronsulfates aus dem fetalen und etwa 10% aus dem maternalen Kreislauf stammen (Rose, 1982; Dibbelt und Kuss, 1983; Daniel, 1985).

2.5.2.1.1 Klassifizierung der Sulfatasen

Beim Menschen unterscheidet man zwei große Gruppen von Arylsulfatasen, die in ihrer subzellulären Lokalisation, ihren physikochemischen Eigenschaften und ihrer Substratspezifität differieren (Dodgson und Rose, 1975). Zum Typ II gehören die Arylsulfatase A und die Arylsulfatase B. Typ I besteht aus der Arylsulfatase C. In der Literatur wird

neben der Arylsulfatase C (Vaccaro et al., 1987; Shankaran et al., 1991) noch über die Steroidsulfatase (Dibbelt und Kuss, 1983; Daniel und Chang, 1990), die Sterylsulfatase (Dibbelt et al., 1989; Dibbelt und Kuss, 1991), die Estronsulfatase (Benedetto et al., 1990; Evans et al., 1991) und die Östrogensulfatase (Dibbelt und Kuss, 1984) berichtet, wobei unklar ist, ob diesen Bezeichnungen das selbe Enzym zugrunde liegt. Einige Autoren gehen davon aus, daß die Arylsulfatase C und die Steroidsulfatase zwei Formen, s-Form und f-Form, des selben Enzyms sind (Vaccaro et al., 1987; Chang et al., 1990; Dibbelt und Kuss, 1991). Andere sprechen von zwei verschiedenen Enzymen (Dijkstra et al., 1987; Ruoff und Daniel, 1991). Die plazentare s-Form der Arylsulfatase C ist der Steroidsulfatase sowohl biochemisch als auch immunologisch sehr ähnlich (Chang et al., 1986; Daniel und Chang, 1990). Das könnte darauf hindeuten, daß es sich bei der s-Form der Arylsulfatase C und der Steroidsulfatase um das gleiche Enzym handelt.

2.5.2.1.2 Enzymeigenschaften

Arylsulfatase Typ II: Die zu Typ II gehörenden Arylsulfatasen A und B sind lösliche lysosomale Enzyme (Dodgson und Rose, 1975). Sie hydrolysieren keine Steroidsulfate, ihre spezifischen Substrate sind: Cerebrosid Sulfatide für Arylsulfatase A (Mehl und Jatzkewitz, 1968; Chang et al., 1986), Dermatansulfate und verwandte Mucopolysaccharidsulfate für Arylsulfatase B (Fluharty et al., 1975; Chang et al., 1986), Substanzen, die sich deutlich von den Substraten der Arylsulfatase C unterscheiden.

Arylsulfatase Typ I: Zu Typ I gehört die Arylsulfatase C, ein unlösliches, membrangebundenes Enzym (Roy, 1976; Noel et al., 1983; Farooqui, 1987). In menschlichen Fibroblasten wurden zwei elektrophoretische Varianten der Arylsulfatase C nachgewiesen. Nach ihrer unterschiedlich schnellen Wanderung bei der Gelelektrophorese unterscheidet man eine s-Form (slow) und eine f-Form (fast) (Chang et al., 1986). Steroidsulfate werden nur von der s-Form der Arylsulfatase C hydrolysiert (Simard et al., 1985; Chang et al., 1990). Natürlich Substrate der s-Form sind Estronsulfat, Pregnenolonsulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat und Cholesterinsulfat, wobei Estronsulfat die höchste Affinität zum Enzym aufweist (Roy, 1976; Gant et al., 1977; Noel et al., 1983). Das Substrat mit der größten physiologischen Bedeutung ist allerdings in der Plazenta Dehydroepiandrosteronsulfat (Diczfalusy, 1969) und in den Fibroblasten der Haut Cholesterin-

sulfat, da sie in vivo in den höchsten Konzentrationen vorliegen (Bergner und Shapiro, 1981; Epstein et al., 1981).

Die f-Form hydrolysiert - wie die s-Form - das artifizielle Substrat 4-Methylumbelliferylsulfat, aber keine Steroidsulfate (Chang et al., 1986). Diese beiden Formen werden gewebspezifisch exprimiert (Shankaran et al. 1991). In der Plazenta wurde nur die s-Form gefunden (Shankaran et al., 1991).

Sowohl die s- als auch die f- Form sind auf dem X-Chromosom codiert, allerdings in unterschiedlichen Genen (Shapiro et al., 1979; Chang et al., 1990). Beide Formen entziehen sich der X-Chromosominaktivierung (Chang et al., 1990). Die beiden Formen unterscheiden sich sowohl im Molekulargewicht als auch in ihrer Substratspezifität, ihrem pH-Optimum, ihrer Thermostabilität und ihrer Antigenität (Simard et al., 1985; Shankaran et al., 1991). Allerdings fanden Shankaran et al. (1991) für das künstliche Substrat 4-Methylumbelliferylsulfat ähnliche Michaelis-Mentens-Konstanten ($= K_m$ -Wert) und isoelektrische Punkte ($= pI$), wogegen Simard et al. (1985) von unterschiedlichen K_m -Werten für 4-Methylumbelliferylsulfat berichtete.

In der humanen Plazenta findet sich die Steroidsulfataseaktivität vor allem im Syncytiotrophoblast und dort in der cytoplasmatischen Kernmembran, der Membran des rauen Endoplasmatischen Reticulums, der Plasmamembran - vor allem in den "coated pits", den Endosomen und Multivesikulären Körperchen; aber auch im endoplasmatischen Retikulum der Gefäßendothelzellen wird sie nachgewiesen. Sie steht also in direktem Kontakt mit dem maternalen und fetalen Blutkreislauf. In Lysosomen und Golgi-Apparat ist kaum eine Steroidsulfataseaktivität zu finden (Dibbelt et al., 1989). Gant et al. (1977) fanden die Steroidsulfatase vor allem im Chorion und dort in erster Linie in den Mikrosomen.

2.5.2.1.3 Steroidsulfatasemangel der menschlichen Plazenta

Ein Steroidsulfatasemangel in der Plazenta kann bei den betroffenen Müttern die Geburt durch verspätetes Einsetzen der Wehentätigkeit und unzureichende Zervixöffnung verzögern. In 75% der Fälle erfolgt dennoch ein spontanes Einsetzen der Wehen. Bei etwa 25% ist das Wachstum des Fetus verlangsamt, und bei ca. 10% endet die Schwangerschaft mit intrauterinem Fruchttod (Taylor, 1982).

Der Steroidsulfatasemangel in der Haut der betroffenen Kinder führt unter anderem da-

zu, daß die physiologische Hydrolyse des Cholesterinsulfats, welches vermutlich als Kittsubstanz zwischen den Zellen des Stratum corneums dient, unterbleibt. Dies verhindert die Abschilferung der äußeren Stratum corneum Zellen, und es kommt zum klinischen Erscheinungsbild der Ichthyosis (Lykkesfeldt und Hoyer, 1983; Elias et al. 1984). In 50% der Fälle findet man Hornhauttrübungen (Sever et al., 1968; Jay et al., 1968; Yoshiike et al., 1985), seltener auch Kryptorchismus (Lykkesfeldt et al., 1985) oder Hodenkrebs (Lykkesfeldt et al., 1983). Die sexuelle Entwicklung und die Fertilität von Patienten mit rezessiver X-Chromosom abhängiger Ichthyosis verlaufen dagegen normal (Bonifas et al., 1987).

2.5.2.2 Die Steroidsulfatase bei anderen Säugetieren

Die meisten untersuchten Steroidsulfatasen sind membrangebundene Enzyme, die in verschiedenen subzellulären Fraktionen verteilt auftreten können (Hobkirk, 1985). Eine Ausnahme bildet die Dehydroepiandrosteronsulfatase im Hypothalamus von *Macaca radiata*, welche im Cytosol nachgewiesen wurde (Lakshmi und Balasubramanian, 1981). Tierartliche und gewebsspezifische Unterschiede in Substratspezifität, subzellulärer Lokalisation, Km-Werten und pH-Optima lassen kaum eine Übertragung von bei einer Tierart gewonnen Erkenntnissen auf eine andere zu. So handelt es sich z.B. bei der hepatischen Arylsulfatase C und der hepatischen Steroidsulfatase von Ratte, Hund, Pavian, Rind, Ziege Schaf und Hauskatze vermutlich um ein einziges Enzym, wohingegen beim Meerschweinchen zwei separate Enzyme isoliert wurden, eine Alkylsulfatase, die Dehydroepiandrosteronsulfat hydrolysiert, sowie eine Arylsulfatase, die Estronsulfat und 4-Methylumbelliferylsulfat hydrolysiert (Ruoff und Daniel, 1991). Die Arylsulfatase C von Schwein, Eichhörnchen und Mensch hydrolysiert weder Estronsulfat noch Dehydroepiandrosteronsulfat, jedoch wurde in der humanen Leber ein separates Enzym für die Hydrolyse von Steroidsulfaten nachgewiesen (Ruoff und Daniel, 1991).

Beim Meerschweinchen wurde eine Steroidsulfataseaktivität in Hoden adulter Tiere, Uterus, Lunge, Nebenniere, Amnion, Ovar, Chorion, Dünndarm, Plazenta, Milz, Niere und Leber gefunden (Hobkirk et al., 1982). Die pH-Optima der einzelnen Steroidsulfatasen lagen zwischen 7,6 und 8,2 (Hobkirk et al., 1982). Die Michaelis-Menten-Konstanten für Estronsulfat sind beim Meerschweinchen gewebsspezifisch; so liegt der Km-Wert der Steroidsulfatase in der Leber bei 10 μM , in der Lunge bei 11 μM , im Ute-

rus bei 25 μM und im Hoden bei 20 μM (Hobkirk et al., 1982). Übereinstimmend war die Steroidsulfataseaktivität beim Meerschweinchen hauptsächlich in der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion lokalisiert, wird aber auch in der Kernfraktion nachgewiesen (Hobkirk et al., 1982; Glutek und Hobkirk, 1990). Im Cytosol wird dagegen kaum eine Steroidsulfataseaktivität gefunden (Hobkirk et al., 1982; Glutek und Hobkirk, 1990). Die Steroidsulfatase des Meerschweinchens zeigt eine Michaelis-Menten-Kinetik (Hobkirk et al., 1982). Sie lässt sich durch anorganische Phosphate, nicht jedoch durch anorganische Sulfate oder Diethylstilbestrol hemmen (Hobkirk et al., 1982). Mit zunehmendem Lebensalter ist in Lunge, Leber und Niere ein Absinken, in den Hoden jedoch eine Zunahme der Steroidsulfataseaktivität zu beobachten (Hobkirk et al., 1982). Im Verlauf der Gravidität bleibt die Steroidsulfataseaktivität in der Decidua basalis des Meerschweinchens konstant, wohingegen im Amnion ein Abfall und - besonders in den letzten drei Wochen der Trächtigkeit - in Plazenta, Endometrium und Chorion ein Anstieg der Steroidsulfataseaktivität beobachtet wurde (Glutek und Hobkirk, 1990).

Bei der Ratte wurde die Steroidsulfatase in Leber (Dolly et al., 1972), Uterus (Pack und Brooks, 1970), Gehirn (Iwamori et al., 1976b), Niere (Kawano und Aikawa, 1987) sowie benignen und malignen Prostatazellen (Huot und Shain, 1988) nachgewiesen. In der Rattenleber liegt ihr pH-Optimum bei 8,0, sie zeigt eine Michaelis-Menten-Kinetik, hat ein Molekulargewicht von 130 kDa und wird durch anorganische Phosphate, anorganische Sulfate sowie Diethylstilbestrol deutlich gehemmt (Iwamori et al., 1976a; Hobkirk et al., 1982). Die Steroidsulfatase in der Rattenleber hydrolysiert Estronsulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat, Pregnenolonsulfat, Testosteronsulfat, Cholesterinsulfat sowie das anorganische Substrat p-Nitrophenylsulfat (Iwamori et al., 1976a). Die K_m -Werte für Estronsulfat sind mit 10 μM bzw. 66,7 μM unterschiedlich angegeben (Iwamori et al., 1976a; Hobkirk et al., 1982). Wahrscheinlich handelt es sich bei der Steroidsulfatase der Rattenleber um ein transmembranöses Protein, dessen aktive Seite auf der Außenseite der Mikrosomen liegt (Moriyasu und Ito, 1982). In der Niere der Ratte wurde eine Arylsulfatase C-Aktivität v.a. im endoplasmatischen Reticulum und den perinukleären Zisternen der Epithelzellen im absteigenden Teil des proximalen Tubulus nachgewiesen (Kawano und Aikawa, 1987). Im Gehirn liegt das pH-Optimum der Steroidsulfatase bei 8,2 (Iwamori et al., 1976b; Lakshmi und Blasubramanian, 1979). Es wird eine hohe Arylsulfatase C- und Steroidsulfataseaktivität im Plexus choroideus, der Adenohypophyse und der Zirbeldrüse gefunden, sie ist an das endoplasmatische Reticulum

und die Zellkernhülle gebunden (Kawano und Aikawa, 1987).

Beim Schaf wurde eine Steroidsulfataseaktivität in Myometrium (Rossier und Pierrepont, 1974), Endometrium (Dwyer und Robertson, 1980) und Plazenta (Mason et al., 1989) tragender Tiere sowie im Gehirn (Lakshmi und Balasubramanian, 1979; Mathew und Balasubramanian, 1982) nachgewiesen. Im Endometrium sinkt die Steroidsulfataseaktivität im Laufe der Gravidität (Dwyer und Robertson, 1980), und in der Plazenta ist die mikrosomale Steroidsulfataseaktivität während der Spätgravidität sehr gering (Mason et al., 1989).

Auch im Endometrium des Schweins wurde eine Steroidsulfataseaktivität gefunden, welche jedoch im Gegensatz zum Schaf während der Gravidität ansteigt (Dwyer und Robertson, 1980).

Im weiblichen Reproduktionstrakt des Hamsters steigt die Steroidsulfataseaktivität nach der Ovulation an und ist wahrscheinlich bei der Kapazitation der Spermien beteiligt (Hobkirk, 1985).

Beim Kaninchen wurde in Uterus (Holinka und Gurpide, 1980) und fetalen Membranen (Challis und Greenblatt, 1980) eine Steroidsulfataseaktivität nachgewiesen.

Eine murine Steroidsulfataseaktivität ist nur in Lunge (Milewich et al., 1984), Leber, Niere und Milz beschrieben (Keinanen et al., 1983; Nelson et al., 1983). In Leber, Niere und Milz wurden zwei Isoformen der Arylsulfatase C gefunden, die hydrophile hydrolysiert keine Steroidsulfate, wohingegen die hydrophobe eine Steroidsulfataseaktivität zeigt (Nelson et al., 1983).

2.5.2.3 Steroidsulfatase beim Rind

Im Gegensatz zur placentaren Steroidsulfatase des Menschen (s.u.) liegen zum homologen Enzym des Rindes kaum Informationen vor. Die Steroidsulfatase spaltet die Sulfatgruppe von konjugierten Steroiden ab (Roy, 1976). In den Plazentomen des Rindes ist sie sowohl im fetalen als auch im maternalen Teil nachweisbar, wobei die vergleichsweise höheren Aktivitäten im Gegensatz zur Östrogensulfotransferase in den Karunkeln gemessen wurden (Mattioli et al., 1984; Möstl et al., 1986). Eine Steroidsulfataseaktivität konnte außer in den Plazentomen noch in deutlich geringeren Mengen im interplacentaren Endometrium und im Allantochorion, nicht aber im Allantoamnion nachgewiesen werden (Janszen et al., 1995). Die Sulfataseaktivität ist nach Janszen et al. (1995) in

der Plazenta von Geburtstieren deutlich höher als in der Plazenta von Tieren am 262. Tag der Trächtigkeit. Dies könnte auf eine Beteiligung der Steroidsulfatase am Anstieg der freien Östrogene unmittelbar ante partum hindeuten (Hoffmann et al., 1997).

Aufgrund der beim Rind unklaren Identität des Enzyms oder der Enzyme, welche die Hydrolyse von sulfokonjugierten Östrogenen katalysieren, soll in den eigenen Untersuchungen hierfür die Bezeichnung Steroidsulfatase verwandt werden.

2.6 Ziel der eigenen Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen den Widerspruch zwischen den in vivo vorwiegend nachgewiesenen konjugierten Östrogenen und den in vitro in großen Mengen gefundenen freien Östrogenen aufzuklären. Zum anderen sollte ein Aktivitätsprofil der Östrogensulfotransferase und der Steroidsulfatase über den Verlauf der zweiten Graviditäts-hälfte erstellt werden. Außerdem sollten die Untersuchungen Aufschluß über die subzelluläre Lokalisation dieser beiden plazentaren Enzyme geben. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sollten dazu beitragen, die Produktionsstätte(n) konjugierter Östrogene während der Gravidität des Rindes zu lokalisieren, mögliche Zielzellen anhand einer Sulfataseaktivität zu identifizieren und dadurch die biologische Bedeutung konjugierter Östrogene aufzuklären. Begleitend erfolgten Untersuchungen zur Hydrolyse von Östrogensulfaten im Myometrium als möglichem Zielgewebe, sowie zur Aktivität von Östrogensulfotransferase und Steroidsulfatase in den steroidogenen Organen Plazenta, Corpus luteum graviditatis und Corpus luteum cyclicum. Ferner wurden die Cortisol-, Progesteron-, Estron und Estronsulfatgehalte im peripheren fetalen und maternalen Blutplasma der Versuchstiere bestimmt, um eventuelle Abweichungen vom physiologischen endokrinen Geschehen während der Gravidität auszuschließen. Zusätzlich wurden die endogenen Östrogengehalte im Karunkel- und Kötyledonengewebe gemessen.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermaterial und Probenentnahme

Es wurden Plazentome von 14 gravid geschlachteten Kühen (Schlachthof Gießen) mit bekanntem Besamungszeitpunkt gewonnen. Je vier Tiere wurden am 150. und 220., je drei Tiere am 240. und 270. Tag der Gravidität geschlachtet. Vor der Schlachtung war von allen Tieren aus der Arteria oder Vena coccygea Blut entnommen worden. Bei Entfernung der Frucht wurde Mischblut aus Arteria und Vena umbilicalis in heparinisierten 15 ml Blutröhrchen aufgefangen. Danach wurden an willkürlich gewählten Lokalisationen sowohl aus dem fruchttragenden als auch aus dem nicht-fruchttragenden Uterushorn insgesamt zwischen 15 - 35 Plazentome entfernt. Darüber hinaus wurden von je drei Tieren am 150. und 240. Tag, sowie von je zwei Tieren am 220. und 270. Tag Myometriumpuben gewonnen. Bei drei am 150. Tag sowie bei zwei am 240. Tag geschlachteten Tieren wurden die Ovarien entnommen. Die Blutproben wurden sofort nach ihrer Entnahme im Eisbad (0°C) gekühlt. Die Plazentome, Ovarien und Uterusproben wurden ebenfalls sofort in eisgekühlten, sterilen PBS-Puffer verbracht. Alle Proben wurden innerhalb von ca. 30 Minuten zur weiteren Verarbeitung ins Labor transportiert, wo direkt mit der Aufbereitung begonnen wurde.

Weiterhin wurden im Rahmen von vier Kaiserschnittentbindungen (relativ oder absolut zu große Frucht) zu regulären Geburtszeitpunkten jeweils zwei bis drei Plazentome gewonnen und zunächst wie oben angegeben behandelt. Soweit es die Umstände zuließen, wurde auch hier vom Muttertier (Vena jugularis) sowie vom Neugeborenen (Vena jugularis) eine Blutprobe gewonnen.

Für ergänzende Untersuchungen wurden von vier laut Ovarbefund im Diöstrus geschlachteten Kühen die Ovarien gewonnen und entsprechend wie oben angegeben ins Labor gebracht.

Tabelle 1: Übersicht über die Probenentnahme

Tag der Gravidität	150	220	240	270	Geburt	nicht gravid
Plazentome	n=4	n=4	n=3	n=3	n=4	
Myometrium	n=3	n=2	n=3	n=2	-	-
Ovarien	n=3	-	n=2	-	-	n=4
fetales Blut	n=4	n=4	n=3	n=3	n=4	-
maternales Blut	n=4	n=4	n=3	n=3	n=4	-

3.2 Präparation des Gewebes

Plazentome: Die Plazentome wurden zuerst durch mehrmaliges Waschen in PBS-Puffer von anhaftendem Blut befreit. Anschließend wurden sie unter einer Sterilwerkbank (LaminAir^R, Heraeus) halbiert und das fetale Trophoblastgewebe durch Zug mit einer Pinzette vom maternalen Karunkelgewebe getrennt. Im maternalen Teil verbliebene fetale Kotyledonenreste wurden einzeln mit der Pinzette entfernt. Das fetale Trophoblastgewebe wurde mit einem Skalpell vom darunterliegenden Bindegewebe abgeschabt. Die oberste Karunkelschicht wurde mit einer Schere stückchenweise abgetragen. Die so erhaltenen fetalen und maternalen „Gewebebreie“ wurden mit dem ca. doppelten Volumen an Ringerlösung DAB8 suspendiert und in einer auf 0°C vorgekühlten Zentrifuge (Minifuge RF^R, Heraeus) bei 450 g zirka 3 Minuten zentrifugiert. Die sich dabei auf dem Gewebeprei ablagernde Erythrozytenschicht wurde sodann mit Hilfe einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Pasteurpipette zusammen mit dem Überstand abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde solange wiederholt, bis keine Erythrozytenablagerung mehr sichtbar war, und der Überstand klar blieb.

Uterus: Das Gesamtmymetrium oder die äußere Längsmuskulatur und die innere Ringmuskulatur des Myometriums wurden präparativ von den restlichen Uterusbestandteilen befreit, mit PBS-Puffer gewaschen und mit der Schere zerkleinert.

Ovarien: Die Corpora lutea graviditatis (n=5) bzw. cyklicae (n=4) wurden freipräpariert, die bindegewebige Kapsel wurde großzügig entfernt und der verbleibende Kern grob mit der Schere zerkleinert.

Alle Arbeitsschritte wurden unter Kühlung des Probenmaterials im Eiswasserbad durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Geräte waren steril und ebenfalls eiskühlt.

Blutproben: Diese wurden nach Verbringung ins Labor zentrifugiert und das gewonnene Plasma bis zur weiteren Aufbereitung (siehe Abschnitt 3.5.1 und 3.5.2) bei ca. -20°C

tiefgefroren aufbewahrt.

3.3 Aufbereitung der Gewebe

3.3.1 Herstellung der Homogenate

Für jedes Tier wurden jeweils 10 g des präparierten Kotyledonen-, Karunkel-, und Myometriumphgewebes mit je 30 ml sterilem, eisgekühltem Ringer-Hepes-Puffer versetzt und mit einem Ultra-Turrax^R dreimal 15 Sekunden mit jeweils zweiminütigen Pausen im Eisbad homogenisiert. Bei den Corpora lutea wurden jeweils 2 g Gewebe mit je 6 ml sterilem, eisgekühltem Ringer-Hepes-Puffer versetzt und wie oben beschrieben homogenisiert.

3.3.2 Herstellung der subzellulären Fraktionen

Für jedes Versuchstier wurden je 25 g des aus Kotyledonen bzw. Karunkeln stammenden Gewebestreues mit jeweils 75 ml 250 mM Sucrosepuffer pH 7,15 versetzt und mit einem Potter zweimal bis zum Boden aufgeschlossen. Die so gewonnene Gewebesuspension wurde durch zwei Lagen Gaze gesiebt und das Filtrat in einer Zentrifuge (Minifuge RT^R, Haereus) bei 600 g über 10 Minuten zentrifugiert. Das Sediment 1 (S1: Kernfraktion) wurde mit 10 ml sterilem, eisgekühltem Sucrosepuffer resuspendiert und zur weiteren Verarbeitung im Eisbad aufbewahrt. Der Überstand 1 wurde in einer Zentrifuge (Biofuge 28 RS^R, Heraeus) 10 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Das Sediment 2 (S2: Mitochondrienfraktion) wurde wiederum mit 10 ml Sucrosepuffer resuspendiert und im Eisbad aufbewahrt. Der verbleibende Überstand 2 wurde in einer Ultrazentrifuge (TGA-65 Ultracentrifuge, Kontron) 60 Minuten lang bei 100000 g zentrifugiert. Das Sediment 3 (S3: Mikrosomenfraktion) wurde ebenfalls mit 10 ml Sucrosepuffer resuspendiert und gemeinsam mit den Sedimentsuspensionen 1 und 2 und dem letzten Überstand 3 (Cytosol) einer Proteinbestimmung nach Bradford (1976) unterzogen. Danach wurden die einzelnen Fraktionen unter Zugabe von Sucrosepuffer bis zur Erreichung der in Tabelle 20 und Tabelle 21 (siehe Anhang 9.1) angegebenen Proteingehalte verdünnt. Alle Zentrifugen waren auf 0°C vorgekühlt, der Sucrosepuffer war steril und eisgekühlt.

3.4 Untersuchungen der Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und Steroidsulfatase unter Zugabe von exogenen Substraten

3.4.1 Herstellung der ^3H -markierten Substratlösungen

Die verschiedenen Substratlösungen wurden aus methanolischen Stammlösungen der jeweiligen ^3H -markierten Substrate und 0,1 %iger Ringer-BSA-Lösung hergestellt. Der Hormongehalt der Substratlösungen wurde für die Inkubation von Homogenaten und Zellfraktionen jeweils auf 0,6 pmol/100 μl eingestellt.

Für die Bestimmung der Substratspezifität der Östrogensulfotransferase (s. Abschnitt 3.4.5) wurde die Substratlösungen auf 0,3 pmol/100 μl eingestellt. Für die Bestimmung der Substratspezifität der Steroidsulfatase sowie für ihre kompetitive Hemmung wurde die Einstellung von 0,6 pmol radioaktiv markierten Substrats pro 100 μl beibehalten.

3.4.2 Herstellung der Kontrollansätze

Zur Untersuchung auf nicht-enzymatische Umwandlungen unter den gewählten Inkubationsbedingungen wurden bei allen Experimenten Gewebeleerwerte und Mediumleerwerte über 30 Minuten inkubiert. Bei den Gewebeleerwerten wurde die Gewebeaufbereitung vor dem Einpipettieren durch 20-minütiges Kochen im Wasserbad inaktiviert. Bei den Mediumleerwerten wurde den Inkubationsansätzen statt der Gewebeaufbereitung die entsprechende Menge Medium (Ringer-Hepes-Puffer + 0,1% BSA) zupipettiert.

3.4.3 Inkubationsansätze unter Verwendung von Gewebehomogenaten

In jeweils gleicher Reihenfolge wurden 1 ml Ringer-Hepes mit 0,1% bovinem Serum Albumin (BSA) als Medium, 200 μl Kötyledonen-, Karunkel-, Myometrium- oder Corpus luteum-Homogenat und 100 μl ^3H -Substratlösung (Estron oder Estronsulfat) in sterile 15 ml Extraktionsröhrchen einpipettiert. Bei den Inkubationsansätzen zur Bestimmung der Östrogensulfotransferaseaktivität wurden dem Inkubationsmedium pro Ansatz jeweils 5 μmol 4-Nitrophenylsulfat Kalium Salz (4NPS) als kompetitiver Hemmer der Steroidsulfatase zugegeben. Vorausgegangene Untersuchungen zur Etablierung der Me-

thodik hatten gezeigt, daß ohne die Hemmung der Steroidsulfatase eine Östrogensulfotransferaseaktivität nicht darstellbar war (Vielemeier, 2000). Die Reaktion wurde mit Einpipettieren des Substrats gestartet und 0, 5, 15 oder 30 min bei 37°C im Wärmeschüttelbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 150 sekündiges Erhitzen der Proben im kochenden Wasserbad abgestoppt. Die Proben wurden bis zu ihrer Auswertung im Tiefgefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

3.4.4 Inkubationsansätze unter Verwendung von subzellulären Fraktionen

Es wurden je 200 µl Sucrosepuffer als Medium, 1 ml der aufbereiteten Fraktionen (vergl. Abschnitt 3.3.2) und 100 µl ³H-Substratlösung (Estron oder Estronsulfat) in dieser Reihenfolge in 15 ml Extraktionsröhrchen einpipettiert. In den Versuchen zur Bestimmung der Östrogensulfotransferaseaktivität wurden auch hier den Inkubationsansätzen jeweils 5 µmol 4NPS zugegeben. Die Reaktion wurde durch das Einpipettieren des Substrats gestartet und 0, 5, 15 oder 30 min bei 37°C im Wärmeschüttelbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 150 sekündiges Verbleiben der Proben im kochenden Wasserbad abgestoppt. Die Proben wurden bis zu ihrer Auswertung im Tiefgefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

3.4.5 Inkubationsansätze zur Untersuchung der Substratspezifität der Östrogensulfotransferase

In den Experimenten zur Untersuchung der Substratspezifität der Östrogensulfotransferase wurde als Probenmaterial gepooltes Cytosol der Kuh 8 eingesetzt, da Cytosol als die Zellfraktion mit der höchsten gemessenen Östrogensulfotransferaseaktivität aus den in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Untersuchungen hervorgegangen war. Pro Inkubationsansatz wurden jeweils 1 ml Cytosol mit je 0,2 ml Medium und 0,1 ml des jeweiligen ³H-markierten Substrates 0, 5, 15 oder 30 min im Wärmeschüttelbad bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Inkubationsansätze durch 150 sekündiges Kochen im Wasserbad abgestoppt. Als Medium wurde Sucrosepuffer verwendet, ferner wurden allen Inkubationsansätzen 5 µmol 4NPS zugefügt. Die verwendeten ³H-markierten Substrate (Dehydroepiandrosteron, Estron, Estradiol-17β, Estradiol-17α, Testosteron und Pregnenolon) wurden in äquimolaren Mengen von 0,3 pmol/Inkubationsansatz einge-

setzt. Die inkubierten Proben wurden bis zu ihrer Auswertung im Gefrierschrank bei -20° C gelagert.

3.4.6 Weiterführende Untersuchungen zur Steroidsulfatase

3.4.6.1 Inkubationsansätze zur Untersuchung der Substratspezifität

In den Experimenten zur Untersuchung der Substratspezifität der Steroidsulfatase wurde als Probenmaterial die gepoolten Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen der Kühe Nr. 4 und 6-10 eingesetzt, da diese Fraktionen (s. Abschnitt 4.2.2) die höchsten Enzymaktivitäten aufwiesen. Zu 1 ml dieser Präparation werden pro Ansatz je 0,2 ml Medium und 0,1 ml des entsprechenden ³H-markierten Substrates (Dehydroepiandrosteronsulfat und Estronsulfat) gegeben. Der Hormongehalt der tritiummarkierten Substratlösungen lag bei 0,6 pmol/Inkubationsansatz. Die Ansätze wurden 0, 5, 15 oder 30 min im Wärmeschüttelbad bei 37° C inkubiert und die Reaktion anschließend durch 150 sekündiges Kochen im Wasserbad abgestoppt. Als Medium wurde Ringer-Hepes-BSA verwendet. Die inkubierten Proben wurden bis zu ihrer Auswertung im Gefrierschrank bei -20° C gelagert.

3.4.6.2 Untersuchung zur kompetitiven Hemmung der Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat durch Estronsulfat

Ziel dieses Experimentes war es, Hinweise zu erhalten, ob die Hydrolyse von 3-Östrogensulfat bzw. neutralen 3 β -Hydroxysteroidsulfaten einem einzigen bzw. mehreren reaktiven Zentren im Enzym zugeordnet werden kann. Im ersten Experiment wurden dazu 0,6 pmol 3H-Dehydroepiandrosteronsulfat in 0,1 ml 0,1 %iger Ringer-BSA-Lösung mit einem 10-, 100-, 1000- oder 10000 fachen Überschuß an Estronsulfat in 0,1 ml 0,1 %iger Ringer-BSA-Lösung mit 0,2 Medium und 1,0 ml gepoolter Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion (siehe Abschnitt 3.4.6.1) 10 min im Wärmeschüttelbad bei 37°C inkubiert.

Um sicherzustellen, daß das Abstoppen der Reaktion nicht nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes erfolgte, wodurch die Ergebnisse des ersten Versuches verfälscht worden sein könnten, wurde ein zweites Experiment mit weniger Gewebe pro Inkubati-

onsansatz und einer halb so langen Inkubationszeit durchgeführt. Dazu wurden 0,6 pmol 3H-Dehydroepiandrosteronsulfat in 0,1 ml 0,1 %iger Ringer-BSA-Lösung mit einem 10-, 100-, 1000- oder 10000 fachen Überschuß an Estronsulfat in 0,1 ml 0,1 %iger Ringer-BSA-Lösung mit 0,2 ml des in Abschnitt 3.4.6.1 beschriebenen Probenmaterials und 1 ml Medium 5 min im Wärmeschüttelbad inkubiert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Inkubationsansätze ohne Zugabe von nicht markiertem Estronsulfat inkubiert. Die Inkubationsansätze wurden anschließend in beiden Versuchen durch 150 sekündiges Kochen im Wasserbad abgestoppt. Alle inkubierten Proben wurden bis zu ihrer Auswertung im Gefrierschrank bei -20° C gelagert.

3.4.7 Aufbereitung und Auswertung der Inkubationsansätze

Die tiefgefrorenen Inkubationsansätze wurden mit je 3,5 ml Toluol überschichtet und im Rotationsmischer bei Raumtemperatur 15 min über Kopf rotierend aufgetaut und durchmischt. Nach ca. 3-minütigem Abzentrifugieren bei 2500 g wurde die wäßrige Phase im Ethylalkohol-Trockeneisbad gefroren und der Toluolüberstand in 15 ml Extraktionsröhrchen dekantiert. Dieser Extraktionsvorgang wurde dreimal wiederholt. Der gesammelte Toluolextrakt (Fraktion der freien Steroide) wurde bei 40°C im HBI Vortex-Evaporator^R niedergetrocknet. Die verbliebene wäßrige Phase jedes Inkubationsansatzes wurde mit 60 µl der Enzymverdünnung β -Glucuronidase-Arylsulfatase aus *Helix pomatia* [Enzymgehalt der eingesetzten Verdünnung: 0,21 Units Arylsulfatase in 60 µl (1 Unit $\hat{=}$ Umsetzung von 1 µmol Phenolphthaleinsulfat pro Minute bei pH 6,2 und 25°C); 0,07 Units β -Glucuronidase (1 Unit $\hat{=}$ Umsetzung von 1 µmol 4-Nitrophenyl- β -D-glucuronid pro Minute bei pH 6,2 und 25°C)] sowie 320 µl Hydrolysepuffer überschichtet, 10 min mit einem Vortexer (REAX 2000 Vortexer, Heidolph) geschüttelt und anschließend im Wärmebad bei 37°C über Nacht inkubiert. Die so einer Hydrolyse unterzogenen Inkubationsansätze wurden mit 3,5 ml Toluol überschichtet und im Rotationsmischer bei Raumtemperatur 15 min über Kopf rotiert. Nach ca. 3-minütigem Abzentrifugieren bei 2500 g wurde die wäßrige Phase im Ethylalkohol-Trockeneisbad gefroren und der Toluolüberstand in 15 ml Extraktionsröhrchen dekantiert. Dieser Extraktionsvorgang wurde zweimal wiederholt, und der gesammelte Toluolextrakt (Fraktion der konjugierten Steroide) wurde bei 40°C im HBI Vortex-Evaporator^R niedergetrocknet.

Die Messung der ^3H -Impulse in den niedergetrockneten Extrakten wurde wie folgt durchgeführt: Den niedergetrockneten Extrakten beider Fraktionen wurden je 0,8 ml Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 300 zugegeben, anschließend wurden sie 10 min im Rotationsmischer über Kopf rotiert. Nach 2-minütigem Zentrifugieren bei 2000 g wurde der in Szintillator rückgelöste Extrakt mit einem Diluter in Szintillatorvials überführt, wobei zweimal mit je 1 ml Szintillationsflüssigkeit nachgespült wurde. Anschließend erfolgte die Messung der ^3H -Aktivität im Szintillationszähler.

Zur Berechnung der stattgefundenen Hydrolyse von Estronsulfat wurde für jeden Inkubationsansatz die Summe der Zählimpulse der freien Steroide und der konjugierten Steroide gebildet. Dann wurde der Quotient aus den gemessenen Zählimpulsen in der Fraktion der freien Steroide und der Summe der Zählimpulse in den Fraktionen von freien und konjugierten Steroiden errechnet. Bei der Berechnung der stattgefundenen Sulfokonjugation von Estron wurde wiederum die Summe der Zählimpulse der freien Steroide und der konjugierten Steroide gebildet. Dann wurde der Quotient aus den gemessenen Zählimpulsen in der Fraktion der konjugierten Steroide und der Summe der Zählimpulse in den Fraktionen von freien und konjugierten Steroiden errechnet.

Die Substratumwandlung wurde entweder direkt in % angegeben oder bei den Inkubationen von Zellfraktionen zusätzlich in absolute Substratumwandlung pro pg Protein umgerechnet.

3.5 Begleitende Untersuchungen zum Verlauf der endogenen Steroidkonzentrationen in Plazenta und peripherem Blutplasma

3.5.1 Bestimmungen fetaler und maternaler Steroidkonzentrationen im peripheren Blutplasma

In allen Blutproben gravid geschlachteter Tiere sowie der zugehörigen Feten wurde der Gehalt an Progesteron, Cortisol, Estron und Estronsulfat mittels im Labor etablierter radioimmunologischer Verfahren (siehe Abschnitt 3.5.2.1 – 3.5.2.3) bestimmt.

3.5.2 Radioimmunologische Bestimmungsverfahren

3.5.2.1 Radioimmunologische Bestimmung von Cortisol

Zur Anwendung kam eine Modifikation des von Hoffmann et al. (1976) beschriebenen Competitionstests. Die Extraktion von 0,1 ml Plasma erfolgte zwei mal mit jeweils 2 ml Ethylacetat, wobei die Trennung durch 35-minütiges Abfrieren bei -30°C und anschließendes Dekantieren der Ethylacetatphase erreicht wurde. Das verwendete Antiserum (GI-COL-IV) war nach Immunisierung von Kaninchen gegen 4-Pregnen-11 β ,17 α ,21-triol,-3,20-dion-3-(O-carboxy-methyl)oxim-BSA(=Cortisol-3-CMO-BSA) gewonnen worden; es wies mit Corticosteron und Cortison eine Kreuzreaktion von 4,3 bzw. 3,2% auf, bei allen anderen überprüften Steroiden lag sie unter 0,1%. Die Intra- bzw. Interassayvariabilität lag bei 4,6 bzw. 12,5%.

3.5.2.2 Radioimmunologische Bestimmung von Progesteron

Die Progesteronbestimmung im Plasma erfolgte nach dem von Hoffmann et al. (1973a) beschriebenen Verfahren. Die genauen Ausführungen über die Testdurchführung finden sich bei Gerres (1991). Es wurden jeweils 0,1 ml Probe zwei mal mit je 2 ml Hexan extrahiert und anschließend durch Abfrieren der wäßrigen Phase im Trockeneisbad getrennt. Das eingesetzte Antiserum (GI-P4-IV) war gegen 11 α -OH-Hydroxyprogesteron-Hemisuccinat-BSA gerichtet. Die Kreuzreaktionen gegen Testosteron lag bei 0,37%, die gegen 17 α -Hydroxy-Progesteron bei 0,49% und die gegen Pregnenolon bei 0,69%. Die anderen Kreuzreaktionen (Cortisol, Androstendion, Estron, Estradiol, Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon) lagen unter 0,01%. Die Intra- bzw. Interassayvariabilität betrugen 4,6 bzw. 14,5%.

3.5.2.3 Radioimmunologische Bestimmung von Estron bzw. Estronsulfat

Estron bzw. Estronsulfat wurde analog zu dem von Hoffmann (1977a) und Gentz (1994) beschriebenen Testverfahren bestimmt. Estronsulfat wurde dazu durch zuvorige Inkubation mit verdünnter β -Glucuronidase-Arylsulfatase aus *Helix pomatia* hydrolysiert und als freies Estron gemessen. Die Proben (0,4 ml) wurden zwei mal mit je 3 ml To-

luol extrahiert. Die niedergetrockneten Extrakte wurden vor dem Einbringen in den RIA zuerst in 80 µl 0,1 n NaOH aufgenommen (Bildung von Phenolaten), geschüttelt und 10 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden 10 µl 0,8 n HCl zur Neutralisation und 10 µl konzentrierter Phosphatpuffer (siehe 3.7.4) zur Korrektur der Ionenstärke und zur Volumenauffüllung zugegeben. Das eingesetzte Antiserum (E1-6-CMO GI II) war gegen Estron-6-Carboxy-Methyl-Oxim-BSA gerichtet. Die Kreuzreaktionen gegen Estradiol-17β lag bei 2,27%, gegen Estradiol-17α bei 0,65%, gegen Estriol bei 0,032%, gegen Progesteron bei 0,013% und gegen Dehydroepiandrosteron bei 0,23%. Die anderen Kreuzreaktionen (Testosteron, Androstendion, Pregnenolon, Cortisol, Dihydrotestosteron, 17α-Hydroxyprogesteron) lagen unter 0,01%. Die Intra- bzw. Interassayvariabilität betrugen 5,0% bzw. 11,7%.

3.5.2.4 Radioimmunologische Bestimmung von Estradiol-17β

Estradiol-17β wurde nach dem bei Hoffmann et al. (1992) beschriebenen Sequenztest mit anschließender Trennung im Ungleichgewicht bestimmt. Die Proben (0,25 ml) wurden zwei mal mit jeweils 2,5 ml Toluol extrahiert. Das verwendete Antiserum (GI-E2β-Pool Kaninchen I) war gegen 1,3,5 (10) Estratrien-3, 17β-diol-6-o-Carboxy-Methyl-Oxim-BSA gerichtet. Die Kreuzreaktionen gegen Estriol lagen bei 0,68%, gegen Estron bei 1,3%. Die anderen Kreuzreaktionen (Pregnenolon, Cortisol, 5α-Dihydro-Testosteron, Androstendion, Dehydroepiandrosteron, Progesteron, Testosteron) lagen unter 0,01%. Die Intra- bzw. Interassayvariabilität betrugen 7,7% bzw. 13,7%.

3.5.3 Bestimmungen der endogenen Steroidkonzentrationen in der Plazenta mittels HPLC-RIA

3.5.3.1 Extraktion der freien Östrogene

Je 400 µl fetales bzw. maternales Gewebe-Homogenat bzw. -Zellfraktion wurden mit 600 µl Phosphatpuffer in 15 ml Glasextraktionsröhrchen pipettiert und mit 3 ml Toluol überschichtet, 15 min im Rotationsmischer extrahiert, abzentrifugiert und im Trockeneisbad abgefroren. Der organische Überstand wurde in 15 ml Glasextraktionsröhrchen

dekantiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die gepoolten Extrakte wurden im Vortex-Evaporator niedertrocknet und mit 1400 µl Methanol unter intensivem Schütteln rückgelöst.

3.5.3.2 Enzymatische Hydrolyse und Extraktion der konjugierten Östrogene

Nach Extraktion der freien Östrogene wurden zu den wäßrigen Phasen jeder Probe 20 µl der mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Enzymverdünnung β -Glucuronidase-Arylsulfatase aus "Helix pomatia" (Enzymgehalt der eingesetzten Verdünnung: 0,013 Units Arylsulfatase in 20 µl (1 Unit $\hat{=}$ Umsetzung von 1 µmol Phenolphthaleinsulfat pro Minute bei pH 6,2 und 25°C); 0,005 Units β -Glucuronidase (1 Unit $\hat{=}$ Umsetzung von 1 µmol 4-Nitrophenyl- β -D-glucuronid pro Minute bei pH 6,2 und 25°C) pipettiert. Anschließend wurden 150 µl Hydrolysepuffer (pH 4,8) zugegeben. Die Proben wurden im Wasserbad bei 37°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag wie unter 3.5.3.1 beschrieben dreimal extrahiert und in 1400 µl Methanol rückgelöst.

3.5.3.3 Säulenchromatographische Vorreinigung

Den in 1400 µl Methanol rückgelösten Proben wurde zur Herstellung eines 35 %igen Methanol/Wasser Gemisches 2600 µl Aqua dest. zugegeben und die Proben gründlich durchgemischt. Die Vorreinigung erfolgte an reversed phase Bakerbond spe Kartuschen, die durch Passage von 1 ml Methanol aktiviert und anschließen mit 3 ml 35 %igem Methanol äquilibriert worden waren. Nach Auftragen der Proben und Passage des Lösungsmittels erfolgte die Elution der Analyten mit 1,5 ml 95 %igem Methanol, die in 5 ml Glasröhrchen aufgefangen wurden. Das Eluat wurde im Trockenschrank bei 35°C niedertrocknet und für die HPLC mit 220 µl 20 %igem Acetonitril rückgelöst.

3.5.3.4 Aufbau der Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Anlage (HPLC)

Die verwendete HPLC-Anlage bestand aus folgenden Komponenten:

- Degaser: ERC-3612^R, Erma Inc., Japan
- Niederdruck-Gradientenmischer: Gradient Former 425^R, Kontron Instruments, Eching
- Pumpe: Zweikolbenpumpe, HPLC Pump 420^R, Kontron Instruments, Echingen
- HPLC-Autosampler 360^R mit 100 µl Probenschleife, Kontron Instruments, Eching
- Vorfilter: REPL Filter 0,5 µm x 3 mm, Rheodyne Inc., California, USA
- Vorsäule : Lichrospher^R RP18-Glaskartusche 150 x 3 mm, E. Merck, Darmstadt
- Säulenmantel: Eigenbau mit angeschlossenem Haake Fe-2 Wärmeumwälzbad, 40°C, Haake Meßtechnik, Karlsruhe
- Fraktionssammler: Fraction Collector Frac-100, Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg

Die Anlage wurde über einen PC (IBM Personal System 2 Model 30) angesteuert, wobei zwischen der seriellen Schnittstelle des PC und den angesteuerten Geräten ein Multiport^R (Kontron Instruments) eingebaut war.

3.5.3.5 Durchführung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Nach der chromatographischen Vorreinigung wurden die Proben mittels HPLC getrennt. Dazu wurde die HPLC-Anlage vor jedem Lauf 10 min lang mit einer 30 %igen wäßrigen Acetonitril-Lösung (v/v) bei einer Flußrate von 0,5 ml/min äquilibriert. Nach Abschluß des Äquilibrierens wurden 100 µl der in 220 µl einer 20 %igen wäßrigen Acetonitril-Lösung (v/v) rückgelösten Probe (s.o.) injiziert. Nach der Probeninjektion wurden die für die Äquilibrierung genannten Bedingungen zunächst 46 min lang beibehalten. Danach wurde der Acetonitril-Anteil der mobilen Phase auf 100% erhöht (Stufengradient). Nach Ablauf der 54-minütigen Chromatographiedauer wurde das Chromatographiesystem für die nächste Trennung äquilibriert. Durch die Chromatographie ³H-markierter Standardsubstanzen wurden für Estradiol-17β, Estradiol-17α und Estron die jeweiligen Retentionszeiten und Zeitintervalle der Elution bestimmt, anhand derer die Einstellung des Fraktionssammlers erfolgte. Die den einzelnen Östrogenen entsprechenden Eluate wurden jeweils als komplette Peaks aufgefangen, im Trockenschrank

bei 40°C unter Vakuum niedertrocknet und nach dem Rücklösen der entsprechenden radioimmunologischen Bestimmung zugeführt.

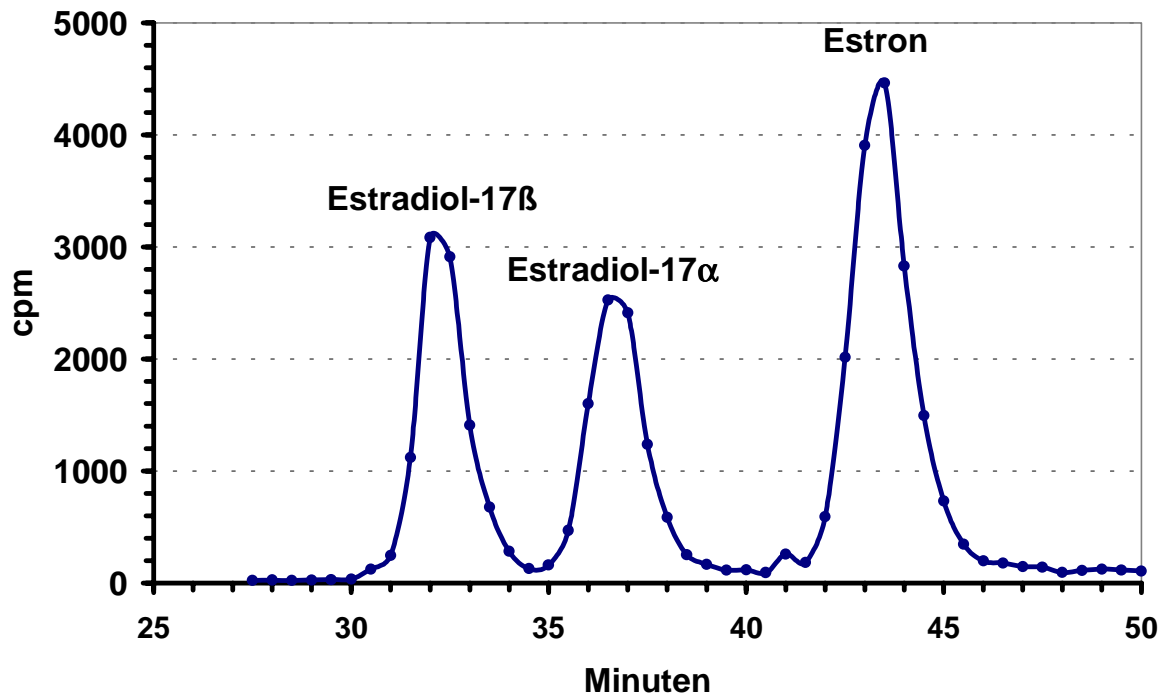


Abbildung 1: Trennung von Östrogenen mittels HPLC vor der radioimmunologischen Bestimmung. Chromatographie ^3H -markierter Standardsubstanzen (Eichchromatogramm). Vorsäule: LiChrospher RP18, 30 mm x 3 mm (E. Merck, Darmstadt), Säule: LiChrosorb RP18, 150 mm x 3 mm (E. Merck, Darmstadt), mobile Phase: Acetonitril / H₂O = 3:7 (v/v), Flußrate: 0,5 ml / min, Temperatur: 40°C.

3.5.3.6 Radioimmunologische Bestimmung der endogenen Hormongehalte der Gewebe: Estron und Estradiol-17β

Es wurden Estron, Estradiol-17β und Estradiol-17α im RIA bestimmt. Für die Bestimmung der endogenen Hormongehalte im Gewebe wurden anstelle der Plasmaextrakte die HPLC-Eluate niedertrocknet und anschließend in 200 ml BSA-Phosphatpuffer pH 7,2 rückgelöst, wovon je 100 µl im RIA eingesetzt wurden. Die Durchführung der RIAs erfolgte wie in Abschnitt 3.5.2.3 bis 3.5.2.4 beschrieben.

3.5.3.7 Radioimmunologische Bestimmung von Estradiol-17 α nach Auftrennung in der HPLC

Estradiol-17 α wurde wie bei Pinho (1995) beschrieben mit dem gegen 17 β -Estradiol-17-Hemisuccinat-BSA gerichteten Antiserum bestimmt. Durch die vorausgegangene chromatographische Trennung war eine spezifische Messung von Estradiol-17 α trotz der kreuzreaktiven Eigenschaften dieses Antiserums möglich. Das eingesetzte ^3H -Estradiol-17 α wurde nach dem von Hoffmann (1977b) beschriebenen Verfahren hergestellt. Die Intra- bzw. Interassayvariabilität betrugen 6,46 bzw. 6,25%.

3.6 Auswertung der Ergebnisse und statistische Berechnungen

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Inkubationsansätze wurden mindestens als Doppelansatz hergestellt und ausgewertet. Bei deutlicher Abweichung (>5%) wurde zur Erhöhung der Präzision ein dritter und ggf. vierter Inkubationsansatz ausgewertet.

Die Datenabspeicherung sowie die Erstellung der graphischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf einem Personalcomputer mit dem Programm Excel 7.0. Die statistische Auswertung der Hormonkonzentrationen im Blutplasma (Kapitel 4.4) wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes SPSS für Windows, Release 6.1.3 durchgeführt.

Die Auswertung der Daten aus den Inkubationsansätzen mit Gewebehomogenat aus Myometrium bzw. Corpus luteum erfolgte deskriptiv unter zu Hilfenahme des Programmes Excel 7.0 auf einem Personalcomputer.

Die Auswertung der Daten aus den Inkubationsansätzen mit Plazentomgewebe (Kapitel 4.1.1 – 4.1.2 und 4.2.1 – 4.2.2) erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP / Dynamic, Release 7.0, (Dixon, 1993).

Die aus den Inkubationsversuchen mit Plazentomgewebe gewonnenen Rohdaten wurden in Abhängigkeit von der Form ihrer Verteilung in unterschiedlicher Weise aufbereitet. Diejenigen Ergebnisse, bei denen die Substratumwandlung in % angegeben war, zeigten eine linksschiefe Verteilung und wurden daher arcsinus-transformiert (Sachs, 1992). Die Daten, bei denen die Substratumwandlung auf den Proteingehalt bezogen war, zeigten

eine rechtsschiefe Verteilung, sie wurden daher einer logarithmischen Transformation unterzogen. Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf von Substratumwandlungen wurde neben dem Kurvenverlauf das Integral (Area Under the Curve = AUC) statistisch ausgewertet. Im Folgenden werden bei den untransformierten Variablen der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ($\bar{x} \pm \sigma$), bei den logarithmisch transformierten Variablen der geometrische Mittelwert und der Streufaktor ($\bar{x}_g * SF^{\pm 1}$) und bei den arcsin-transformierten Variablen der Median und der einfache Streubereich nach Rücktransformation ($M \pm S$) angegeben.

Der Einfluß des Trächtigkeitsstadium sowie der der Gewebeherkunft wurde mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (zweifache Anova) mit den Variablen Trächtigkeitsdauer (T-Dauer) und maternaler bzw. fetaler Gewebeherkunft (Herkunft) untersucht. Für die Untersuchung des Einflusses der subzellulären Fraktionen (Aufbereitung) wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse (dreifache Anova) mit den Variablen T-Dauer, Herkunft und Aufbereitung als Einflußfaktoren durchgeführt (Programm: BMDP2V).

Die Steroidhormongehalte im Blutplasma der Versuchstiere wurden zum einen zwischen Mutter und Kalb verglichen und zum anderen der Einfluß des Graviditätsstadiums untersucht. Die Hormonkonzentrationen der Kühe wurden mit denen der Fruchte mit Hilfe eines gepaarten t-Tests verglichen, wobei für Progesteron, Estronsulfat und Estradiol-17 β alle Trächtigkeitsstadien in einem Test zusammengefaßt wurden. Bei der Auswertung der Estronkonzentrationen wurden wegen der im unmittelbaren Geburtszeitraum stattfindenden Veränderungen in der Plasmakonzentrationen freier Östrogene (Hoffmann et al. 1976; Möstl et al. 1981; Robertson 1974), die Proben in eine ante partum- sowie eine Geburtsgruppe aufgeteilt. Gleichfalls wurden auch hinsichtlich der Cortisolbestimmung die Proben in eine ante partum- sowie eine Geburtsgruppe zusammengefaßt, da es im Rahmen der Geburtsinduktion in der fetalen Nebennierenrinde zu einer massiven Cortisolproduktion kommt (Hoffmann et al., 1976; Taverne et al. 1986). Die 270 Tage graviden Tiere wurden hier nicht in die Auswertung einbezogen, da der genaue Geburtstermin nicht vorhersagbar war und daher Unklarheit über die korrekte Zuordnung bestand. Der Einfluß des Trächtigkeitsstadiums auf die Hormongehalte wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests untersucht.

3.7 Liste der verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Pufferlösungen

3.7.1 Chemikalien

NaCl	Braun, Melsungen
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Ringerlösung DAB8	Braun, Melsungen
1M HEPES-Puffer (1M)	Sigma, Deisenhofen
(N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid))	
Bovines Serumalbumin	Sigma, Deisenhofen
4-Nitrophenylsulfate Potassium Salt	Fluka, Buchs, CH
Sucrose	Serva, Heidelberg
Tris / HCl pH 7,4	Serva, Heidelberg
1n NaOH	Merck, Darmstadt
1n HCl	Merck, Darmstadt
Toluol p. a.	Merck, Darmstadt
Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 300	Zinsser, Frankfurt 1008300
Beta-Glucuronidase / Arylsulfatase aus Helix pomatia	Serva, Heidelberg
1n CH ₃ COOH	Merck, Darmstadt
Methanol für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Methanol p. a.	Merck, Darmstadt
Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Protein Assay Kit II ^R	Bio-Rad, München
Estrone Sulfate Potassium Salt	Makor Chemicals LTD, Jerusalem, Israel

3.7.2 ³H-markierte Steroide

(6,7- ³ H)-Estrone	NEN, Dreieich
(6,7- ³ H)-Estrone Sulfate, Ammonium Salt	NEN, Dreieich
(2,4,6,7- ³ H)-Estradiol-17β	NEN, Dreieich

(1,2,6,7- ³ H)-Dehydroepiandrosterone	NEN, Dreieich
(7- ³ H)-Dehydroepiandrosterone Sulfate, Sodium Salt	NEN, Dreieich
(1,2,6,7- ³ H)-Testosterone	Amersham, Braunschweig
(1,2,6,7- ³ H)-Progesterone	NEN, Dreieich
(1,2,6,7- ³ H)-Cortisol	NEN, Dreieich
(2,4,6,7- ³ H)-Estradiol-17 α	Dieses wurde wie bei Hoffmann (1977b) beschrieben aus ³ H-Estron hergestellt.

3.7.3 Materialien und Geräte

Ultra-Turrax ^R	Janke + Kunkel, Staufen
Potter 60 ml mit zylindrischem Teflonpistill	Braun, Melsungen
Minifuge RF	Heraeus, Hanau
Biofuge 28 RS	Heraeus, Hanau
TGA-65 Ultracentrifuge	Kontron, München
REAX 2000 Vortexer	Heidolph
Sterilwerkbank LaminAir HA 2448 GS	Haereus, Karlsruhe
HBI Vortex-Evaporator ^R	Haake Buchler, Saddle Brook, N.J., U.S.
Vakuumpumpe N726.3 FT18	Neuberger, Freiburg-Munzingen
Vakuumentrockenschrank	Heraeus, Karlsruhe
Varifuge 30 R	Heraeus, Hanau
Rotationsmischer Typ REAX-2	Heidolph, Kelkheim
Wärmeschüttelbad Typ 3047	Köttermann, Hänigsen
Zinsser minis 2000	Zinsser, Frankfurt
Wheaton Minis Vitro 180	Zinsser, Frankfurt
Wheaton 15ml	Zinsser, Frankfurt
Flüssigszintillationszähler LS 5000 TD	Beckman Instruments, Fullerton, California, U.S.
Baker spe-10 Column Processing System ^R	Baker Inc., Groß-Gerau
Bakerbond spe-Trennsäulen C ₁₈ , 1ml	Baker Inc., Groß-Gerau
Vorfilter REPL Filter 0,5 μ m x 3 mm	Latek, Eppelheim 7335
Lichrospher RP 18 Glaskartusche 30-3	Merck, Darmstadt 15674

Lichrosorb RP 18 Glaskartuschen 150-3	Merck, Darmstadt 15654
Multiport ^R	Kontron Instruments, Eching
Degaser ERS-3612 ^R	ERC, Alteglofsheim
Niederdruck Gradientenmischer: Gradient	Kontron Instruments, Eching
Former 425 ^R	
Zweikolbenpumpe: HPLC Pump 420 ^R	Kontron Instruments, Eching
HPLC-Autosampler 360 ^R mit 100µl	Kontron Instruments, Eching
Probenschleife	
Fraktionssammler: Fraction Collector	Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg
Frac-100	
Haake Fe-2 Wärmeumwälzbad	Haake Meßtechnik, Karlsruhe
Medifuge	Heraeus, Hanau

3.7.4 Herstellung der Pufferlösungen

PBS-Puffer pH 7,5:	16,0 g NaCl 2,88 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g KH_2PO_4 ad 2000 ml Aqua dest. anschließend 2 h bei 140° C sterilisieren
Ringer-HEPES:	390 ml Ringer-Lösung 10 ml HEPES-Puffer
Ringer-HEPES-BSA:	390 ml Ringer-Lösung 10 ml HEPES-Puffer 400 mg bovines Serumalbumin
Sucrosepuffer pH 7,15:	128,4 g Sucrose 4,728 g Tris / HCl pH 7,4 ad 1500 ml Aqua dest. pH-Wert mittels 1n NaOH auf 7,15 einstellen
Hydrolysepuffer pH 4,8:	300 ml 1n NaOH 500 ml 1n CH_3COOH
BSA-Phosphatpuffer:	2,686 g KH_2PO_4 8,357 g Na_2HPO_4 0,325 g NaN_3 ad 1 l Aqua dest. 1 g BSA

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung auf das Vorkommen von Östrogensulfotransferase durch Darstellung der Sulfokonjugation von ^3H -Estron zu ^3H -Estronsulfat

4.1.1 Inkubationen mit Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe

4.1.1.1 Einfluß des Trächtigkeitsstadiums

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Sulfokonjugation von ^3H -Estron in Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe sind - getrennt nach Gewebe und nach Trächtigkeitsstadien gruppiert – in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt. Die entsprechenden Zahlenangaben finden sich in Abschnitt 9.2.1 in den Tabellen 22 und 23. Unabhängig vom Graviditätsstadium und der Herkunft des inkubierten Gewebes fand der Großteil der Substratumwandlung innerhalb der ersten 15 Minuten der 30-minütigen Inkubation statt; in der zweiten Hälfte der Inkubationszeit war eine Substratumwandlung kaum noch zu beobachten.

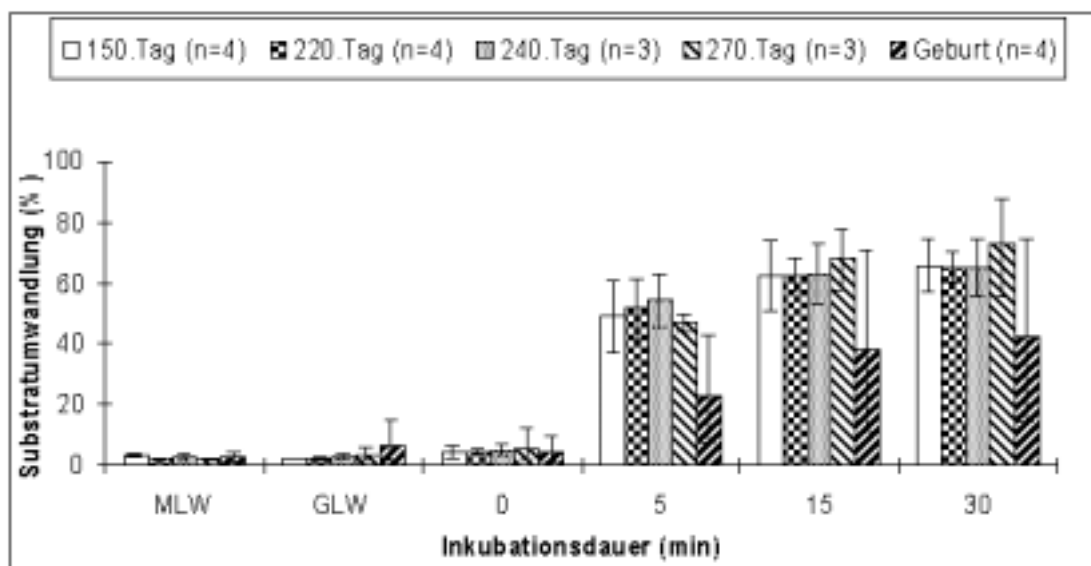


Abbildung 2: Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch Kotyledonengewebehomogenat zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Gravidität sowie unter der Geburt. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in %. Die Mediumleerwerte (MLW) und Gewebeleerwerte (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die arcsin-transformierten Meßwerte der Tiere eines Trächtigkeitsstadiums sind nach Rücktransformation als Median mit einfachem Streubereich angegeben.

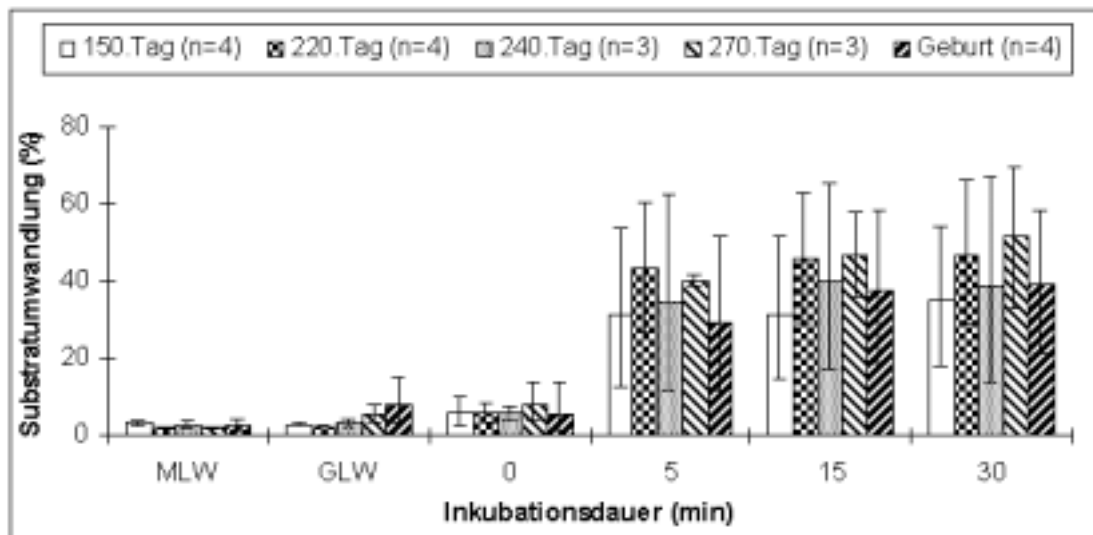


Abbildung 3: Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch Karunkelgewebeshomogenat zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Gravidität sowie unter der Geburt. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in %. Die Mediumleerwerte (MLW) und Gewebeleerwerte (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die arcsin-transformierten Meßwerte der Tiere eines Trächtigkeitsstadiums sind nach Rücktransformation als Median mit einfachem Streubereich angegeben.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse (siehe Anhang 9.2.1 Tabelle 24) für die Bezugsgrößen „Substratumsetzung zu den einzelnen Inkubationszeitpunkten“ (0-30 min) und die AUC ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Graviditätsstadien. Es wurde keine Wechselwirkung zwischen dem Einfluß der Gewebeherkunft und dem Trächtigkeitsstadium nachgewiesen.

4.1.1.2 Einfluß der Gewebeherkunft

Da sich weder für Kotyledonengewebe noch für Karunkelgewebe ein signifikanter Unterschied in der Sulfokonjugation von ^3H -Estron in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Trächtigkeitsstadium, Geburt) ergab (s.o.), wurden zur weiteren Darstellung der Einflußgröße „Gewebeherkunft“ die Ergebnisse der Inkubationen mit Kotyledonen bzw. Karunkelhomogenaten aller Tiere zu einer Gruppe ($n = 18$) zusammengefaßt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt, die zugehörigen Daten finden sich im Abschnitt 9.2.1 in Tabelle 25.

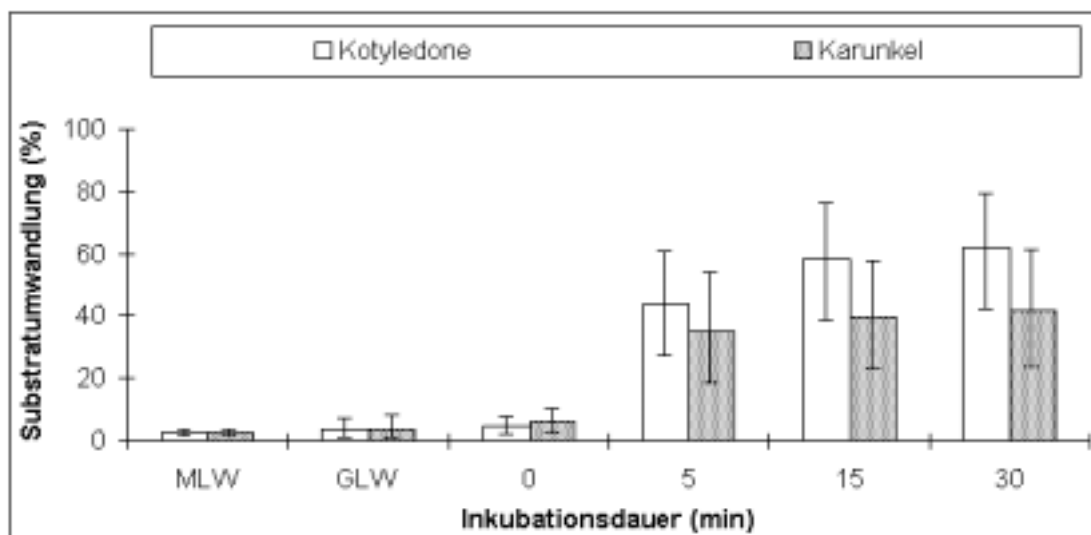


Abbildung 4: Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebekomogenat ($n = 18$). Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in %. Die Mediumleerwerte (MLW) und Gewebeleerwerte (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die arcsin-transformierten Meßwerte sind nach Rücktransformation als Median mit einfachem Streubereich angegeben.

Die in Abbildung 4 ersichtliche höhere Substratumwandlung durch Homogenate aus Kotyledonengewebe wird durch die zweifaktorielle Varianzanalyse (siehe Anhang 9.2.1 Tabelle 24) für die Inkubationszeitpunkte 5, 15 und 30 min mit $p < 0,01$ bzw. 0,001 signifikant bzw. hochsignifikant bestätigt. Entsprechend war der Unterschied in der AUC (50,9 bei der Inkubation mit Kotyledonengewebehomogenat, 36,2 bei der Inkubation mit Karunkelgewebekomogenat) mit $p < 0,001$ hochsignifikant. Der Einfluß der Gewebeherkunft auf die Substratumwandlung war unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt (Trächtigkeitsdauer bzw. Geburt) der Versuchstiere (keine Wechselwirkung zwischen Herkunft und T-Dauer, s.o.).

4.1.2 Inkubationen mit subzellulären Fraktionen

Da von den Geburtstieren für die getrennte Aufbereitung von Kotyledonen- und Karunkelgewebe in die subzellulären Fraktionen S1 (Kernfraktion), S2 (Mitochondrienfraktion), S3 (Mikrosomenfraktion) und Cyt (Cytosol) nicht mehr genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, beschränkten sich die durchgeführten Untersuchungen auf die Graviditätstage 150, 220, 240 und 270. Das Ergebnis der Inkubationen ist in den Tabellen 26 bis 33 im Anhang 9.2.2 wiedergegeben. Dabei zeigte sich, daß eine nennenswerte Sulfatierung vor allem bei der Inkubation mit Cytosol zu beobachten war. Das Ergebnis

der dreifaktoriellen Varianzanalyse ergibt sich aus Tabelle 34 (Abschnitt 9.2.2). In Übereinstimmung mit den Inkubationen von Gewebehomogenat zeigten sich keine Abhängigkeiten vom Graviditätszeitpunkt, dagegen von der Herkunft (Kotyledone oder Karunkel, $p < 0,001$) und der Art der subzellulären Fraktion (Aufbereitung, $p < 0,001$).

In einem weiteren Auswertschritt wurden daher auch hier alle Tiere zu einer Gruppe ($n = 14$) zusammengefaßt. Das Ergebnis ist zusammenfassend in den Abbildungen 5 und 6 wiedergegeben, die Meßwerte finden sich im Anhang 9.2.2 in den Tabellen 35 und 36. Sowohl für das Kotyledonen- als auch für das Karunkelgewebe ergaben sich für das Cytosol ca. 10 (Kotyledone) bis 15 (Karunkel) mal höhere Umwandlungsraten (dreifaktorielle Varianzanalyse: $p < 0,001$) als in den Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen, die sich nicht unterschieden. Der Unterschied in der Umwandlungsrate zwischen Cytosol aus Kotyledonen- ($AUC = 8,4$) bzw. Karunkelgewebe ($AUC = 4,1$) war hochsignifikant (zweifaktorielle Varianzanalyse: $p (AUC) < 0,001$; Anhang 9.2.2, Tabelle 37), während zwischen den verschiedenen Trächtigkeitszeitpunkten auch hier kein signifikanter Unterschied nachgewiesen wurde. Der Verlauf der Sulfokonjugation bei Inkubationen mit Cytosol war vergleichbar mit den Homogenatinkubationen (siehe Abbildung 2 und 3).

Auch hier wurde das Reaktionsgleichgewicht bereits nach 15 Minuten annähernd erreicht. Die beiden Einflußfaktoren Gewebeherkunft und Aufbereitung sind unabhängig voneinander und auch unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt (Trächtigkeitsdauer bzw. Geburt) der untersuchten Tiere (Dreifaktorielle Varianzanalyse : keine Wechselwirkung zwischen Herkunft, T-Dauer und Aufbereitung, siehe Anhang 9.2.2, Tabelle 34).

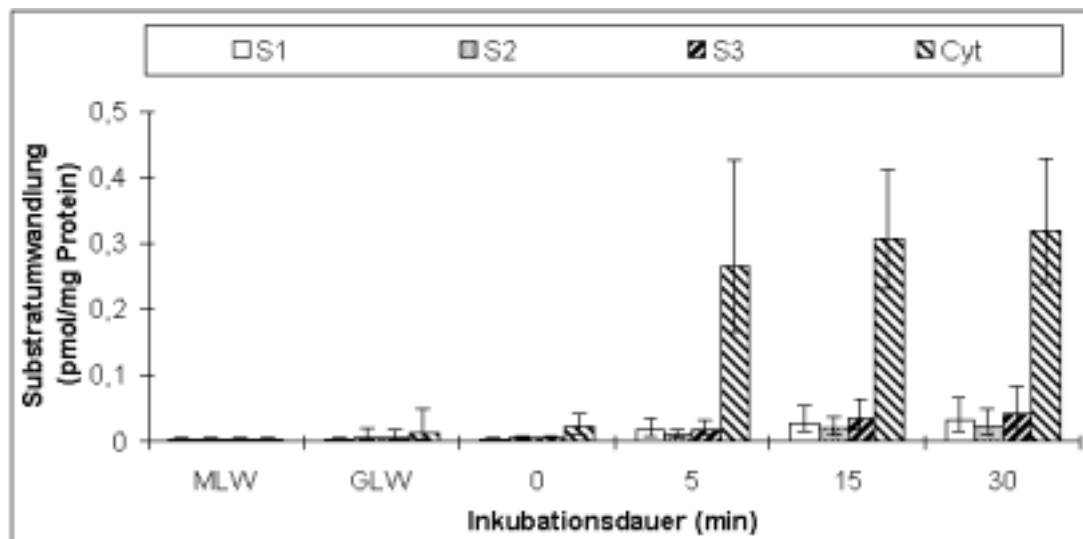


Abbildung 5: Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Kottyledonengewebe (S1 = Kernfraktion, S2 = Mitochondrienfraktion, S3 = Mikrosomenfraktion und Cyt = Cytosol; $n = 14$). Dargestellt ist die Substratumwandlung in pmol pro mg Protein. Die Mediumleerwerte (MLW) und Gewebeleerwerte (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die logarithmisch transformierten Daten wurden nach Rücktransformation als geometrischer Mittelwerte und Streubereich ($\bar{x}_g * SF^{\pm 1}$) angegeben.

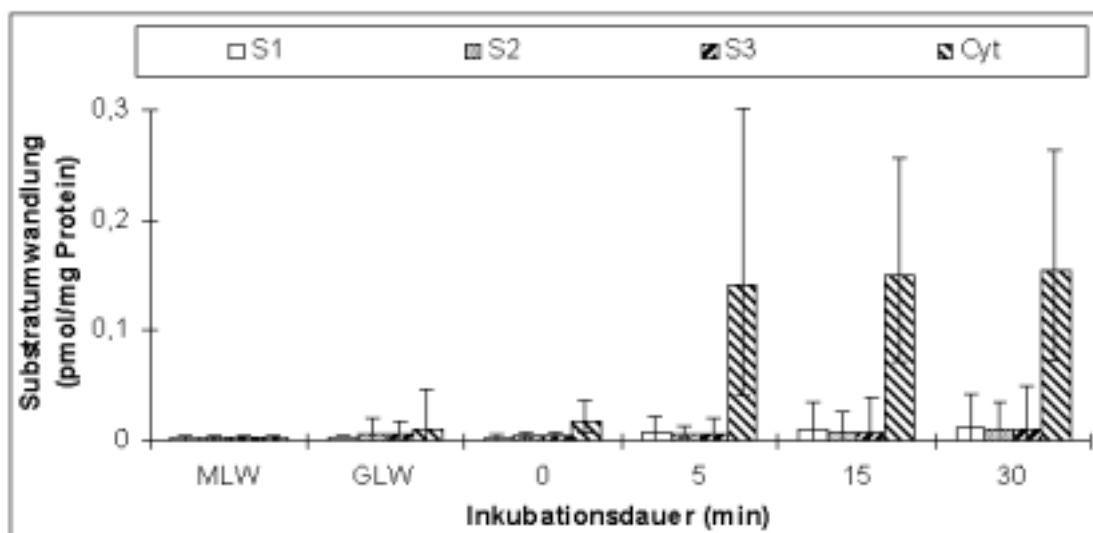


Abbildung 6: Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe (S1 = Kernfraktion, S2 = Mitochondrienfraktion, S3 = Mikrosomenfraktion und Cyt = Cytosol; $n = 14$). Dargestellt ist die Substratumwandlung in pmol pro mg Protein. Mediumleerwerte (MLW) und Gewebeleerwerte (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die logarithmisch transformierten Daten wurden nach Rücktransformation als geometrischer Mittelwerte und Streubereich ($\bar{x}_g * SF^{\pm 1}$) angegeben.

4.1.3 Untersuchung zur Substratspezifität der Östrogensulfotransferase

Bei der Inkubation äquimolarer Mengen (0,3 pmol) verschiedener phenolischer bzw. neutraler Steroide mit gepoolter Cytosolfraktion aus Kotyledonen- und Karunkelgewebe eines 240 Tage graviden Tieres zeigte sich, daß ^3H -Estradiol-17 β und ^3H -Estron praktisch gleichermaßen rasch und mit hoher Ausbeute sulfokonjugiert wurden, das Reaktionsgleichgewicht war bereits nach 5 Minuten annähernd erreicht (70% Umwandlung). ^3H -Estradiol-17 α wurde ebenfalls in erheblichem Ausmaß sulfokonjugiert. Die Umwandlung erfolgte jedoch deutlich langsamer, so waren nach 30-minütiger Inkubation erst ca. 60% des angebotenen ^3H -Estradiol-17 α in ^3H -Estradiol-17 α -sulfat umgewandelt. Wurden den Inkubationsansätzen Dehydroepiandrosteron (3 β -OH-androst-5en-17on), Pregnenolon (3 β -OH-pregn-5en-20on) oder Testosteron (17 β -OH-androst-5en-3on) als Substrat angeboten, war keine Umwandlung feststellbar (siehe Abbildung 7). Die gemessenen Medium- und Gewebeleerwerte lagen bei $2,0 \pm 1,0\%$ Substratumwandlung. Damit ergibt sich eine hohe Substratspezifität der erfaßten plazentaren Östrogensulfotransferase beim Rind.

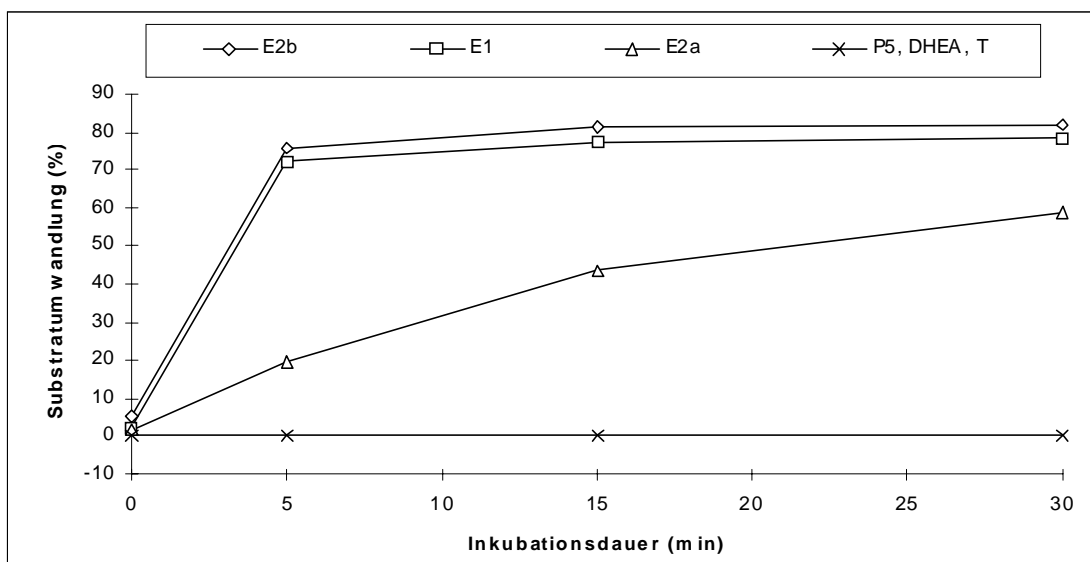


Abbildung 7: Sulfokonjugation verschiedener phenolischer bzw. neutraler Steroide bei Inkubation mit gepoolter Cytosolfraktion von Kotyledonen- und Karunkelgewebe eines 240 Tage tragenden Tieres. Dargestellt ist die Substratumwandlung in % (Mittelwert der Doppelbestimmungen) bezogen auf die eingesetzte Substratmenge. Legende: E2b = Estradiol-17 β , E1 = Estron, E2a = Estradiol-17 α , DHEA = Dehydroepiandrosteron, T = Testosteron und P5 = Pregnenolon.

4.2 Untersuchungen auf das Vorkommen von Steroidsulfatase durch Erfassung der Umwandlung von ^3H -Estronsulfat zu ^3H -Estron

4.2.1 Inkubationen mit Homogenaten aus Kotyledonen- und Karunkelgewebe

4.2.1.1 Einfluß des Trächtigkeitsstadiums

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat in Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe sind - getrennt nach Gewebe und nach Trächtigkeitsstadien gruppiert - in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt. Die entsprechenden Zahlenangaben finden sich in Abschnitt 9.3.1 in den Tabellen 38 und 39. In beiden Geweben ist eine Steroidsulfataseaktivität nachweisbar.

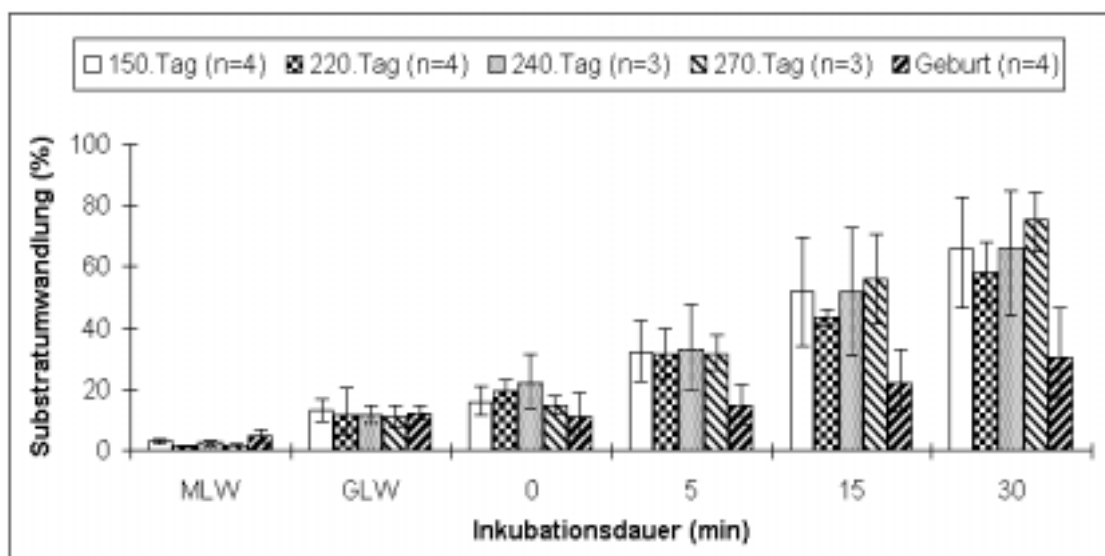


Abbildung 8: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch Homogenat aus Kotyledonengewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Gravidität sowie unter der Geburt. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % bezogen auf die zugesetzte Substratmenge. Die Mediumleerwerte (MLW) und Gewebeleerwerte (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die arcsin-transformierten Meßwerte der Tiere eines Trächtigkeitsstadiums sind nach Rücktransformation als Median mit einfachem Streubereich angegeben.

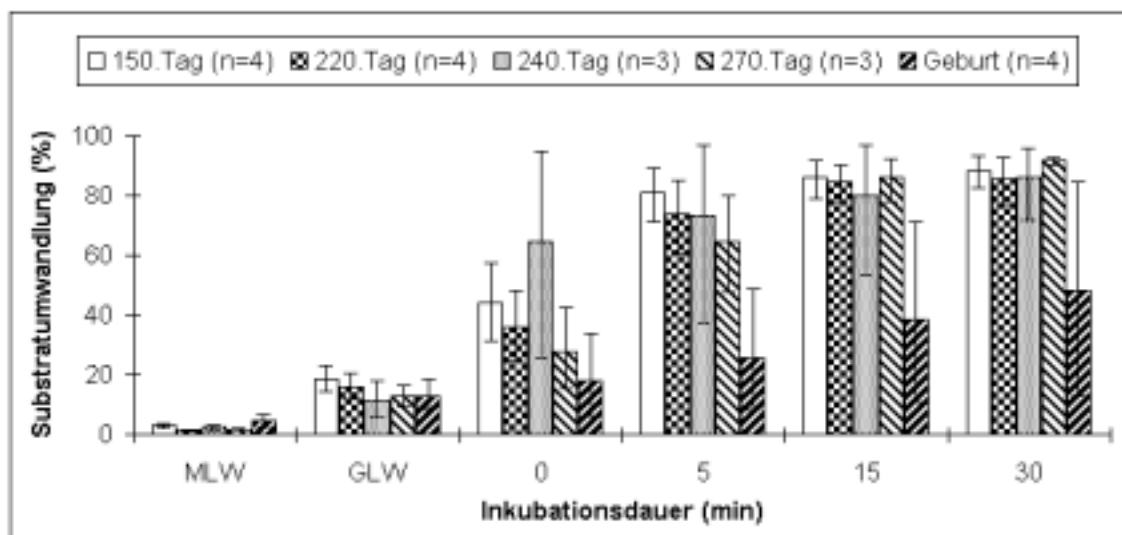


Abbildung 9: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch Homogenat aus Karunkelgewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Gravidität sowie unter der Geburt. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % bezogen auf die zugesetzte Substratmenge. Die Mediumleerwerte (MLW) und Gewebeleerwerte (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die arcsin-transformierten Meßwerte der Tiere eines Trächtigkeitsstadiums sind nach Rücktransformation als Median mit einfachem Streubereich angegeben.

Die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse sind im Anhang 9.3.1, Tabelle 40 wiedergegeben. Dabei zeigte sich bei Einbeziehung aller Untersuchungszeitpunkte (gravide Tiere plus Geburtstiere) ein schwach signifikanter Einfluß der Trächtigkeitsdauer (T), der wegfällt, wenn die Geburtstiere in einem zweiten Rechengang nicht berücksichtigt werden. Damit ergibt sich, daß der aus den Abbildungen 8 und 9 erkennbare Abfall der Steroidsulfataseaktivität unter der Geburt signifikant ist. Bei alleiniger Berücksichtigung der graviden Tiere war ein Einfluß der Trächtigkeitsdauer auf die Hydrolyse, bezogen auf die einzelnen Meßzeitpunkte (0-30 min) und die AUC nicht nachweisbar. Weiterhin ergab sich ein hochsignifikanter Einfluß der Gewebeherkunft (Kotyledone bzw. Karunkel, $p < 0,001$).

4.2.1.2 Einfluß der Gewebeherkunft

Zur besseren Verdeutlichung des Effektes der Variablen „Gewebeherkunft“ wurden in einem zweiten Rechengang die Ergebnisse der Inkubationen mit Kotyledonen- bzw. Karunkelhomogenaten aller Tiere zu jeweils einer Gruppe ($n = 18$) zusammengefaßt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 10. Die zugehörigen Daten finden sich im Abschnitt 9.3.1 in Tabelle 41.

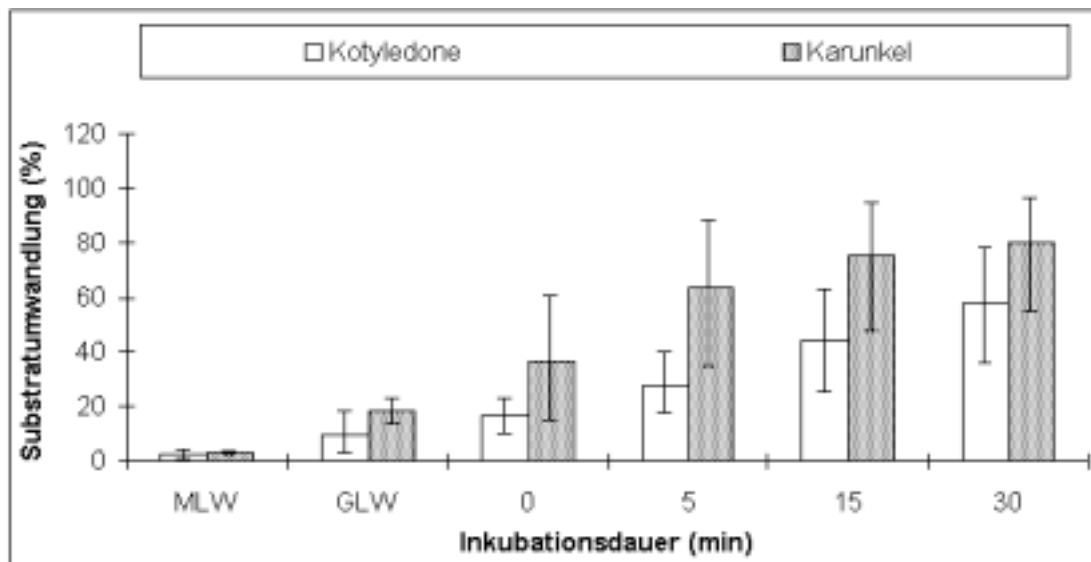


Abbildung 10: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch Homogenat aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe ($n = 18$). Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % bezogen auf die zugesetzte Substratmenge. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die arcsin-transformierten Meßwerte sind nach Rücktransformation als Median mit einfachem Streubereich angegeben.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse (siehe Anhang 9.3.1, Tabelle 40) ergab sowohl mit als auch ohne Einbeziehung der Geburtstiere für die Umwandlungsraten zu allen Inkubationszeitpunkten bei Inkubation mit Karunkelgewebekomogenat eine signifikant höhere Substratumwandlung ($p < 0,001$) als bei der Inkubation mit Kotyledonengewebekomogenat. Wie Abbildung 10 weiter zeigt, war bei Inkubation mit Homogenat aus Karunkelgewebe bereits nach 5 Minuten das Reaktionsgleichgewicht annähernd erreicht, während bei Inkubation mit Homogenat aus Kotyledonengewebe ein eher linearer Anstieg über 30 Minuten zu beobachten war. Entsprechend war die AUC mit 69,5 im Karunkelgewebekomogenat signifikant ($p < 0,001$) höher als im Homogenat aus Kotyledonengewebe (40,5). Mit Ausnahme der 5 min-Werte unter Berücksichtigung der Geburtsgruppe gab es sowohl mit als auch ohne Einbeziehung der Geburtstiere weder zu den verschiedenen Inkubationszeiten noch bei der AUC eine Wechselwirkung zwischen dem Einfluß der Gewebeherkunft und dem Einfluß der Trächtigkeitsdauer, d.h. der Unterschied zwischen Karunkel- und Kotyledonengewebe ist unabhängig vom Trächtigkeitsstadium.

4.2.2 Inkubationen mit subzellulären Fraktionen

Da ein Einfluß des Trächtigkeitsstadiums auf die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat weder bei Verwendung von Homogenaten gravider Tiere (Tag 150, 220, 240 und 270) (siehe Kapitel 4.2.1.1) noch bei Verwendung der subzellulären Fraktionen nachweisbar war (vergl. Abschnitt 9.3.2, Tabelle 42), wurden auch hier - unter Weglassung der Geburtstiere bei denen wegen des geringen Probenvolumens (1-2 Karunkeln) keine subzellulären Fraktionen gewonnen werden konnten - alle Tiere zu einer Gruppe ($n = 14$) zusammengefaßt. Das Ergebnis ist zusammenfassend in den Abbildungen 11 und 12 wiedergegeben, die einzelnen Meßwerte finden sich im Anhang 9.3.2 in den Tabellen 43 bis 52.

Sowohl für das Kotyledonen- als auch für das Karunkelgewebe ergaben sich hinsichtlich der Umwandlungsraten, bezogen auf die Proteinkonzentrationen der subzellulären Fraktionen, signifikante Unterschiede (dreifaktorielle Varianzanalyse: $p < 0,001$; Abschnitt 9.3.2, Tabelle 53). Die höchsten Umwandlungsraten fanden sich stets in der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktion. Doch auch in der Kernfraktion des Karunkelgewebes wurde - auf den Proteingehalt bezogen - eine deutliche Hydrolyse des angebotenen ^3H -Estronsulfats beobachtet. Die Kernfraktion des Kotyledonengewebes sowie das Cytosol des Kotyledonen- und des Karunkelgewebes waren im Vergleich dazu deutlich weniger aktiv (siehe Abbildung 11 und 12). Die dreifaktorielle Varianzanalyse (Abschnitt 9.3.2, Tabelle 53) ergab mit Ausnahme der 30 min Werte einen signifikanten Einfluß ($p < 0,05$) der „Gewebeherkunft“ auf die Hydrolyse des angebotenen ^3H -Estronsulfates. Es war dabei ausschließlich zwischen Aufbereitung und Gewebeherkunft eine signifikante Wechselwirkung nachweisbar, wobei im Kotyledonengewebe im Verhältnis zum Karunkelgewebe die Steroidsulfataseaktivität im Cytosol etwas höher und in der Kernfraktion etwas niedriger war. Auch für die AUC ergaben sich signifikante Unterschiede in den Umwandlungsraten zwischen Kotyledonen- und Karunkelgewebeaufbereitungen ($p < 0,05$), sowie zwischen den einzelnen subzellulären Fraktionen ($p > 0,001$), wobei diese beiden Einflußfaktoren nicht unabhängig voneinander wirken (Wechselwirkung zwischen Aufbereitung und Gewebeherkunft: $p < 0,001$).

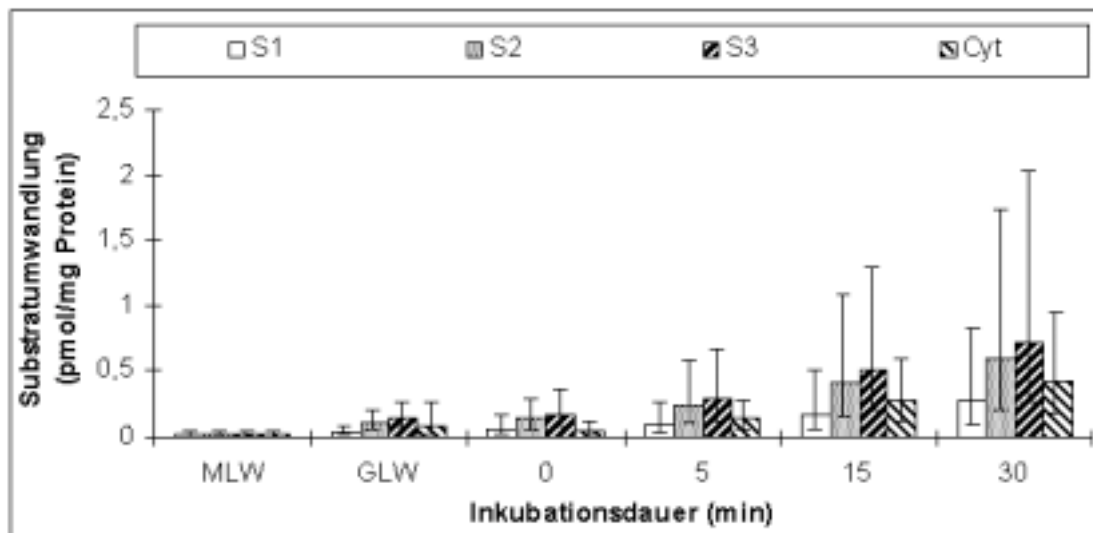


Abbildung 11: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe (S1 = Kernfraktion, S2 = Mitochondrienfraktion, S3 = Mikrosomenfraktion und Cyt = Cytosol; $n=14$). Dargestellt ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die logarithmisch transformierten Daten wurden nach Rücktransformation als geometrischer Mittelwerte und Streubereich ($\bar{x}_g * SF^{\pm 1}$) angegeben.

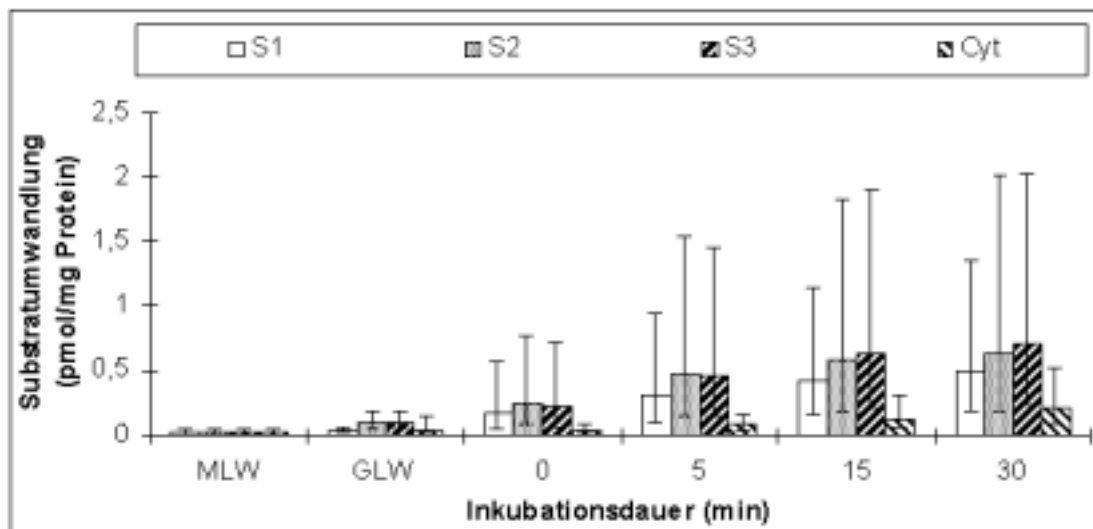


Abbildung 12: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe (S1 = Kernfraktion, S2 = Mitochondrienfraktion, S3 = Mikrosomenfraktion und Cyt = Cytosol; $n=14$). Dargestellt ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Die logarithmisch transformierten Daten wurden nach Rücktransformation als geometrischer Mittelwerte und Streubereich ($\bar{x}_g * SF^{\pm 1}$) angegeben.

4.2.3 Substratspezifität der Steroidsulfatase

Bei den Untersuchungen zur Substratspezifität der placentaren Steroidsulfatase traten in besonderem Maße die bereits in den vorausgegangenen Versuchen in allerdings geringerem Maße beobachteten methodischen Probleme bei der Definition des Startpunktes der Inkubation auf. So fanden sich bei Inkubation äquimolarer Mengen an ^3H -markiertem Estronsulfat bzw. Dehydroepiandrosteronsulfat mit gemischten Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen aus Kotyledonen und Karunkelgewebe (Tag 150, 240 und 270) in der Fraktion der freien Steroide in den Mediumleerwerten nach 30-minütiger Inkubation nur 5% bzw. 4,9% der ^3H -Aktivität (siehe Tabelle 2). Bei der 30-minütigen Inkubation der beiden Substrate mit Probenmaterial, welches vor dem Einbringen zur Enzymaktivierung hitzebehandelt worden war (= Gewebleerwert), betrugen die entsprechenden Meßwerte 28,5% bzw. 50,2%. Die entsprechenden Meßwerte der Proben, welche unmittelbar nach dem Pipettieren zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion hitzebehandelt wurden (= 0-Minuten-Probe) betrugen 57,2% bzw. 58,3%. Aufgrund der niedrigen Umwandlungsraten in den Mediumleerwerten kann ein nicht-enzymatischer Zerfall als Ursache der hohen Umwandlungsraten in den Gewebleerwerten und den 0-Minuten-Proben ausgeschlossen werden (siehe Diskussion Abschnitt 5.2.5). Weitere mögliche Ursachen dieser methodischen Probleme werden im Abschnitt 5.1 diskutiert. Ausgehend von 0-Minuten-Werten von annähernd 60% konnte mit beiden Substraten im weiteren Verlauf der Inkubation ein zeitabhängiger Anstieg der Umwandlungsraten beobachtet werden. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationsdauer wurden mit Estronsulfat eine 91%ige, mit Dehydroepiandrosteronsulfat eine 72%ige Umwandlung des angebotenen Substrates gemessen. Unbeschadet der methodischen Probleme kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß in der Plazenta des Rindes sowohl Sulfate von phenolischen als auch von 3β -Hydroxy-5en-Steroiden hydrolysiert werden.

Tabelle 2: Hydrolyse von ^3H -Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) und ^3H -Estronsulfat (E1S) bei Inkubation mit einem Gemisch aus Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen. Dargestellt ist die Hydrolyse der einzelnen Substrate in Prozent bezogen auf die eingesetzte Substratmenge in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Zum Vergleich sind weiterhin die Umwandlungsraten nach 30-minütiger Inkubation mit hitzeinaktiviertem Probenmaterial (Gewebeleerwert = GLW) sowie von Inkubationsansätzen ohne Zusetzen von Probenmaterial (Mediumleerwert = MLW) angegeben.

Inkubationszeit	DHEAS Substratumwandlung (%)	E1S Substratumwandlung (%)
MLW	4,9	5,0
GLW	50,2	28,5
0	58,3	57,2
5	61,0	88,1
15	67,2	90,5
30	72,0	91,1

4.2.4 Versuche zur kompetitiven Hemmung der Steroidsulfatase

Zur kompetitiven Hemmung der Steroidsulfatase mit einem 10 bis 10000fachen Überschuß an nicht markiertem Estronsulfat wurden zwei Versuche durchgeführt (s. Kap. 3.4.6.2). Als Substrat diente ^3H -Dehydroepiandrosteronsulfat. Bei beiden Versuchen waren die Mediumleerwerte konstant niedrig bei $6,5 \pm 1,8\%$.

Die Inkubation erfolgte mit gepoolter (1ml) kotyledonärer und karunkulärer Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion (150, 240, 270 Tage tragende Tiere). Im ersten Versuch (siehe Tabelle 3) wurde die Inkubation nach zehn Minuten abgestoppt. Die Substratumwandlung lag beim Gewebeleerwert (GLW = hitzeinaktiviertes Gewebe) bei $48,7 \pm 1,4\%$. Die darüber hinausgehende Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat zu Dehydroepiandrosteron in den weiteren Inkubationsansätzen blieb auch nach Zugabe des 10- bis 10000 fachen Überschusses an Estronsulfat konstant bei $63,3 \pm 2,6\%$. Eine Hemmung der Hydrolyse war demnach nicht erkennbar.

Tabelle 3: Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) nach 10-minütiger Inkubation mit 1 ml Gemisch aus Mikrosomen- und Mitochondrienfraktion bei Zugabe von steigenden Mengen an Estronsulfat. Dargestellt ist die Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat in Prozent der eingesetzten Substratmenge in Abhängigkeit vom zugegebenen Überschuß an Estronsulfat (E1S).

Verhältnis DHEAS:E1S	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Substratum-wandlung (%)	64,1	62,4	58,7	65,4	65,7

Im zweiten Versuch wurde die in den Inkubationsansatz eingebrachte Menge an gepoolter Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion auf 0,2 ml reduziert (siehe Abschnitt 3.4.6.2) und die Reaktion nach fünfminütiger Inkubationsdauer abgestoppt. Die Gewebeleerwerte lagen hierbei bei $20,5 \pm 2,9\%$ Substratumwandlung. Die Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat zu Dehydroepiandrosteron blieb auch hier nach Zugabe von 10- bis 10000 fachem Überschuß an Estronsulfat konstant bei $20,9 \pm 2\%$, und somit im Bereich des Gewebeleerwertes. Eine Hemmung der Hydrolyse war nicht erkennbar.

4.3 Begleitende Pilotuntersuchungen zur Bedeutung konjugierter Östrogene während der Gravidität des Rindes

Begleitend zu den Hauptuntersuchungen mit Plazentagewebe wurden punktuelle Untersuchungen zum Vorkommen einer Östrogensulfotransferase- bzw. Steroidsulfataseaktivität im Myometrium und im Lutealgewebe durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten erste Antworten auf folgende Fragen bringen:

1. Kommen Myometrium (Wachstum) bzw. Corpus luteum (Interaktion zwischen Ovar und plazentarer Steroidbiosynthese) als Zielorgane plazentarer konjugierter Östrogene in Frage („Sulfatase-Pathway“), und
2. ist die Expression einer Steroidsulfatase beim Rind allgemeines Charakteristikum sexualsteroidproduzierender Zellen, oder ist sie spezifisch für die Plazenta?

4.3.1 Sulfokonjugation von ^3H -Estron und Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat in Homogenaten aus Myometrium

Untersuchungen zur Aktivität von Östrogensulfotransferase bzw. Steroidsulfatase wurden mit Myometrium 150, 220, 240 und 270 Tage tragender Rinder durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte aus zufällig ausgewählten Lokalisationen. Bei einem Teil der Tiere wurden alle Schichten des Myometriums umfassende Homogenate hergestellt (Gesamtmyometrium), ansonsten wurden die innere Ringmuskelschicht und äußere Längsmuskelschicht separat aufbereitet und den Untersuchungen zugeführt. Wie die Ergebnisse der Inkubationen mit Gesamtmyometrium zeigen (vergl. Tabelle 4), schwankt die gefundene Östrogensulfotransferaseaktivität erheblich. Während in einem Teil der Proben keine bzw. lediglich eine marginale Umwandlung zu beobachten war,

wurde die höchste Umwandlungsrate von 47,4% bei einem 270 Tage tragenden Tier gefunden.

Bei der getrennten Untersuchung von Probenmaterial aus der inneren Ringmuskelschicht (siehe Tabelle 6) bzw. der äußeren Längsmuskelschicht Ringmuskelschicht (siehe Tabelle 5) fanden sich nur marginale Umwandlungen, wobei sich der bei den Inkubationen von Gesamtmyometrium gewonnene Eindruck einer mit zunehmender Graviditätsdauer ansteigenden Östrogensulfotransferaseaktivität nicht bestätigte.

Eine zeitabhängige Zunahme der ^3H -Aktivität in der Fraktion der freien Östrogene wurde bei der Inkubation aller Myometriumsproben mit ^3H -Estronsulfat beobachtet (siehe Tabelle 7, 8 und 9). Allerdings wurden auch nach Ablauf der maximalen Inkubationsdauer von 30 Minuten im Vergleich zu Plazenta-Homogenaten lediglich marginale Umwandlungen erzielt. Die höchsten Differenzen zwischen 30 Minuten-Werten und den zugehörigen Gewebeleerwerten lagen noch unter 11%. Ein Zusammenhang der Steroidsulfataseaktivität mit dem Graviditätsstadium bzw. mit einer der beiden Muskelschichten war nicht zu erkennen.

Tabelle 4: Sulfokonjugation von ^3H -Estron in Homogenaten aus Gesamtmyometrium. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

Kuh-Nr.	Tag der Gravidität	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% ^3H -Aktivität in der Fraktion der konjugierten Östrogene)					
		MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
1	220	2,5	10,5	2,2	2,6	4,5	5,5
2	220	1,8	33,6	2,4	6,6	14,5	29,0
4	240	2,0	2,0	4,1	10,0	23,5	34,6
5	270	1,5	2,5	2,7	10,6	31,7	47,4
$\bar{x} \pm \sigma$		$1,9 \pm 0,3$	$12,1 \pm 11,5$	$2,9 \pm 0,7$	$7,4 \pm 2,9$	$18,6 \pm 9,1$	$29,1 \pm 13,6$

Tabelle 5: Sulfokonjugation von ^3H -Estron in Homogenaten aus äußerer Längsmuskulatur des Uterus. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

Kuh-Nr.	Tag der Gravidität	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% 3H-Aktivität in der Fraktion der konjugierten Östrogene)					
		MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
9	150	3,5	2,4	2,6	2,8	3,8	4,8
10	150	2,6	2,9	3,7	4,4	4,7	8,0
11	150	2,4	2,7	3,5	4,6	5,7	5,7
7	240	2,0	2,3	6,7	6,2	18,5	32,4
8	240	4,3	3,6	2,3	2,7	4,1	5,0
6	270	2,1	2,5	4,2	5,3	10,7	18,3
$\bar{x} \pm \sigma$		$2,8 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,4$	$3,8 \pm 1,4$	$4,3 \pm 1,3$	$7,9 \pm 5,3$	$12,4 \pm 10,1$

Tabelle 6: Sulfokonjugation von ^3H -Estron in Homogenaten aus innerer Ringmuskulatur des Uterus. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

Kuh-Nr.	Tag der Gravidität	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% 3H-Aktivität in der Fraktion der konjugierten Östrogene)					
		MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
9	150	3,5	2,4	2,3	4,2	8,0	12,4
10	150	2,6	3,1	2,7	2,3	3,1	2,7
11	150	2,4	2,3	2,7	2,8	2,9	2,8
7	240	2,0	2,7	3,2	6,0	13,1	21,1
8	240	4,3	3,8	2,7	4,3	5,7	9,7
6	270	2,1	2,4	2,1	2,7	4,2	5,3
$\bar{x} \pm \sigma$		$2,8 \pm 0,8$	$2,8 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,4$	$3,7 \pm 1,3$	$6,2 \pm 3,6$	$9,0 \pm 6,5$

Tabelle 7: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat in Homogenaten aus Gesamtmyometrium. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

Kuh-Nr.	Tag der Gravidität	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% ^3H -Aktivität in der Fraktion der freien Östrogene)					
		MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
1	220	—*	11,5	4,2	5,5	6,3	7,4
2	220	1,5	3,5	3,8	4,3	5,9	8,1
4	240	3,5	2,2	3,6	4,6	5,8	6,5
5	270	1,9	2,8	2,5	3,7	6,7	10,9
$\bar{x} \pm \sigma$		$2,3 \pm 0,7$	$5,0 \pm 3,4$	$3,5 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,6$	$6,2 \pm 0,3$	$8,2 \pm 1,5$

*Meßwert aus technischen Gründen nicht bestimmt.

Tabelle 8: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat in Homogenaten aus äußerer Längsmuskulatur des Uterus. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

Kuh-Nr.	Tag der Gravidität	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% ^3H -Aktivität in der Fraktion der freien Östrogene)					
		MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
9	150	2,1	6,0	4,9	5,5	7,3	10,9
10	150	4,4	11,3	8,7	10,2	11,9	12,7
11	150	2,5	5,2	5,1	6,3	7,8	10,6
7	240	1,6	1,9	3,4	4,0	6,2	7,1
8	240	2,3	3,2	4,0	5,0	6,8	10,0
6	270	1,7	2,8	3,5	3,8	5,1	7,6
$\bar{x} \pm \sigma$		$2,4 \pm 1,0$	$5,1 \pm 3,1$	$4,9 \pm 1,8$	$5,8 \pm 2,1$	$7,5 \pm 2,1$	$9,8 \pm 1,9$

Tabelle 9: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat in Homogenaten aus innerer Ringmuskulatur des Uterus. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

Kuh-Nr.	Tag der Gravidität	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% ^3H -Aktivität in der Fraktion der freien Östrogene)					
		MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
9	150	2,1	4,8	6,6	7,3	10,3	15,5
10	150	4,4	7,5	9,2	9,8	12,4	12,4
11	150	2,5	5,4	4,2	6,0	6,7	7,0
7	240	1,6	3,5	5,1	5,4	9,0	11,8
8	240	2,3	7,0	8,9	10,1	12,7	17,6
6	270	1,7	5,2	4,7	5,6	7,7	11,8
$\bar{x} \pm \sigma$		$2,4 \pm 1,0$	$5,6 \pm 1,3$	$6,4 \pm 2,0$	$7,4 \pm 1,9$	$9,8 \pm 2,2$	$12,7 \pm 3,3$

4.3.2 Sulfokonjugation von Estron und Hydrolyse von Estronsulfat in Homogenaten aus Lutealgewebe gravider bzw. zyklischer Rinder

Untersuchungen zur Aktivität von Östrogensulfotransferase bzw Steroidsulfatase in Homogenaten aus Trächtigkeitsegelbkörpern wurden an 150 ($n = 3$) und 240 ($n = 2$) Tage tragenden Rindern durchgeführt. Zum Vergleich wurden vier Gelbkörper zyklischer Tiere untersucht. Weder bei den graviden (siehe Tabelle 10) noch bei den ingraviden Tieren (siehe Tabelle 11) war eine eindeutige Sulfokonjugation von ^3H -Estron zu verzeichnen. Dagegen war sowohl bei den Corpora lutea der graviden (siehe Tabelle 12) als auch bei denen der ingraviden Tiere (siehe Tabelle 13) eine deutliche Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat festzustellen.

Tabelle 10: Sulfokonjugation von ^3H -Estron in Homogenaten aus Corpora lutea gravidier Rinder. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

Kuh-Nr.	Tag der Gravidität	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% ^3H -Aktivität in der Fraktion der konjugierten Östrogene)					
		MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
9	150	3,5	3,3	3,7	4,7	3,5	3,6
10	150	2,6	2,8	2,7	2,8	2,7	2,4
11	150	2,4	7,2	3,3	3,4	4,0	3,7
7	240	2,0	2,6	2,7	3,7	4,1	4,5
8	240	4,3	5,0	3,3	3,5	3,7	4,8
$\bar{x} \pm \sigma$		$2,9 \pm 0,8$	$4,2 \pm 1,7$	$3,1 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,8$

Tabelle 11: Sulfokonjugation von ^3H -Estron in Homogenaten aus Corpora lutea zyklischer Rinder. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

C.l.	Größe (mm ³)	Farbe	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% ^3H -Aktivität in der Fraktion der konjugierten Östrogene)					
			MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
1	5x10x15	gelb	2,1	2,5	8,4	10,3	10,3	10,0
2	5x10x15	rot	2,1	2,3	4,5	5,5	5,3	4,7
3	5x15x15	orange	2,1	3,6	4,2	5,1	4,3	4,3
4	10x12x12	rot	2,1	2,4	3,2	3,6	4,3	4,9
$\bar{x} \pm \sigma$			$2,1 \pm 0,0$	$2,7 \pm 0,5$	$5,1 \pm 2,0$	$6,2 \pm 2,5$	$6,0 \pm 2,5$	$6,0 \pm 2,4$

Tabelle 12: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat in Homogenaten aus Corpora lutea gravider Rinder. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

Kuh-Nr.	Tag der Gravidität	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% ^3H -Aktivität in der Fraktion der freien Östrogene)					
		MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
9	150	2,1	30,1	35,2	50,1	66,8	75,6
10	150	4,4	37,2	41,2	47,8	58,8	64,6
11	150	2,5	31,8	37,2	42,8	50,8	61,6
7	240	1,6	16,3	31,3	34,3	47,5	53,6
8	240	2,3	20,9	25,1	27,2	37,5	49,1
$\bar{x} \pm \sigma$		2,61,0	27,2 \pm 7,6	34,0 \pm 5,5	40,4 \pm 8,6	52,3 \pm 10,0	60,9 \pm 9,2

Tabelle 13: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat in Homogenaten aus Corpora lutea zyklischer Rinder. Dargestellt ist die mittlere Substratumwandlung in % pro Einzelprobe. Der Mediumleerwert (MLW) und Gewebeleerwert (GLW) wurden nach 30-minütiger Inkubation gemessen. Pro Inkubationszeitpunkt wurden Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (σ) berechnet.

C.I.	Größe (mm ³)	Farbe	Umwandlungsrate zu den einzelnen Inkubationszeiten (% ^3H -Aktivität in der Fraktion der freien Östrogene)					
			MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min
1	5x10x15	gelb	4,0	10,7	19,1	20,5	24,3	28,0
2	5x10x15	rot	4,0	21,8	29,3	29,9	37,0	38,2
3	5x15x15	orange	4,0	30,7	36,7	40,6	54,6	66,3
4	10x12x12	rot	4,0	18,9	27,9	30,6	34,2	46,2
$\bar{x} \pm \sigma$			4,0 \pm 0,0	20,5 \pm 7,2	28,2 \pm 6,3	30,4 \pm 7,1	37,5 \pm 10,9	44,7 \pm 14,0

4.4 Steroidhormonkonzentration im Blutplasma der Versuchstiere

Im Vordergrund stand die Bestimmung der streßunabhängigen Hormone Estron und Estronsulfat als physiologische Kontrolle des Graviditätszeitpunktes. Auch des fetale Cortisol muß als streßunabhängig betrachtet werden, während maternales Cortisol (Entnahme am Schlachthof bzw. während der Operationsvorbereitung) als streßbeeinflußt angesehen werden muß (Hoffmann et al., 1977). In Ergänzung dazu wurde dann noch – außer bei den Geburtstieren – bei der Mehrzahl der Tiere Progesteron bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefaßt.

Tabelle 14: Konzentrationen von Estron, Estronsulfat, Cortisol und Progesteron im Blut der Versuchstiere. \bar{x} = arithmetischer Mittelwert; σ = Standardabweichung.

Graviditätsdauer	Kuh Nr.	Estron (nmol/l)	Estronsulfat (nmol/l)	Cortisol (nmol/l)	Progesteron (nmol/l)
150 Tage	9	0,82	5,66	127,90	26,92
	10	0,43	2,15	203,00	28,08
	11	0,97	7,50	145,80	24,96
	18	0,70	2,00	143,50	-
	\bar{x}	0,73	4,33	155,05	26,65
	σ	0,19	2,35	28,52	1,28
220 Tage	1	0,84	12,40	32,90	15,39
	2	0,59	9,20	149,20	51,96
	3	0,57	4,60	115,30	26,83
	12	0,40	4,50	119,20	-
	\bar{x}	0,60	7,68	104,15	31,39
	σ	0,16	3,33	43,18	15,27
240 Tage	4	1,12	38,50	87,00	25,88
	7	0,80	24,86	112,30	29,41
	8	1,96	21,52	102,80	29,27
	\bar{x}	1,29	28,29	100,70	28,19
	σ	0,49	7,35	10,44	1,63
270 Tage	5	3,07	49,50	103,80	19,46
	6	4,46	45,30	23,60	14,55
	13	12,10	47,50	98,00	-
	\bar{x}	6,54	47,43	75,13	17,01
	σ	3,97	1,72	36,52	2,46
Geburt (Sectio)	14	13,40	56,30	42,30	-
	15	6,90	25,60	98,80	-
	16	8,80	63,10	122,70	-
	17	9,20	34,10	46,80	-
	\bar{x}	9,58	44,78	77,65	-
	σ	2,37	15,41	34,20	-

Tabelle 15: Konzentrationen von Estron, Estronsulfat, Cortisol und Progesteron im Blutplasma der Feten bzw. Kälber aus den Versuchstieren. \bar{x} = arithmetischer Mittelwert; σ = Standardabweichung.

Graviditätsdauer	Kalb Nr.	Estron (nmol/l)	Estronsulfat (nmol/l)	Cortisol (nmol/l)	Progesteron (nmol/l)
150 Tage	9	0,12	58,52	8,79	<0,8
	10	-*	-*	16,60	<0,8
	11	0,11	141,10	15,70	<0,8
	18	0,20	3,60	2,90	-
	\bar{x}	0,14	67,74	11,00	<0,8
	σ	0,04	56,51	5,57	-
220 Tage	1	0,18	50,00	14,60	<0,8
	2	0,15	24,54	18,40	<0,8
	3	0,03	15,64	7,93	<0,8
	12	0,20	14,10	2,10	-
	\bar{x}	0,14	26,07	10,76	<0,8
	σ	0,07	14,38	6,25	-
240 Tage	4	0,26	64,30	25,90	<0,8
	7	0,26	27,96	13,70	<0,8
	8	0,12	56,36	19,70	<0,8
	\bar{x}	0,21	49,47	19,77	<0,8
	σ	0,07	15,63	4,98	-
270 Tage	5	0,35	150,00	40,10	<0,8
	6	0,25	206,80	82,60	<0,8
	13	189,00	126,40	28,70	-
	\bar{x}	63,20	161,07	50,47	0,8
	σ	88,95	33,74	23,19	-
Geburt (Sectio)	14	-	-	-	-
	15	132,80	61,07	160,50	-
	16	138,50	99,00	96,30	-
	17	140,00	88,30	102,60	-
	\bar{x}	137,10	83,00	119,80	-
	σ	3,10	15,68	28,89	-

*Bei Kalb 10 reichte das gewonnene Plasma nicht mehr für die Bestimmung von Estron und Estronsulfat aus.

Estron und Estronsulfat weisen im maternalen und fetalen Plasma den erwarteten trüch-tigkeitsbedingten Anstieg von Tag 150 bis zur Geburt auf (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,01$ (maternal) und $p < 0,05$ (fetal)). Der Anstieg des Estrongehaltes zum Ende der Trüch-tigkeit ist im fetalen Plasma deutlicher ausgeprägt als im maternalen. Umgekehrt ist der Anstieg der Estronsulfatkonzentration im maternalen Plasma deutlicher zu verfolgen. Die Estronsulfatkonzentration lag zu allen erfaßten Zeitpunkten im fetalen Plasma höher als im maternalen (gepaarter t-Test: $p < 0,001$). Estron lag an den Tagen 150 – 240 im

maternalen Plasma in höheren Konzentrationen vor als im fetalen (gepaarter t-Test: $p < 0,001$), zum Geburtszeitpunkt wurden jedoch im fetalen Plasma höhere Estrongehalte als im maternalen gemessen (gepaarter T-Test: $p < 0,001$).

Auch der Cortisolgehalt zeigt im fetalen Plasma den erwarteten Anstieg zum Geburtszeitpunkt (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,05$).

4.5 Steroidhormonkonzentration in der Plazenta der Versuchstiere

Im Rahmen dieser Begleituntersuchungen wurden im Kotyledonen- und Karunkelhomogenat der Kühe 1-4 und 6-11 (Tag 150, 220 und 240: $n = 3$ Tiere bzw. Tag 270: $n = 1$ Tier) Estradiol-17 β , Estradiol-17 α und Estron nach der Auftrennung mittels HPLC gemessen (siehe Abschnitt 3.5.3). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 16 und 17 wiedergegeben. Die Ergebnisse wiesen insgesamt eine hohe Streubreite auf, zwischen Kotyledonen- und Karunkelgewebe konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die Durchschnittswerte für Estradiol-17 β und Estron schwankten zwischen 5,1 und 38,3 bzw. 30 und 200 pmol/g Gewebe, wobei sich für beide Steroide die Tendenz eines Anstieges von Tag 150 auf Tag 270 zeigte. Die Gewebskonzentrationen von Estradiol-17 α lagen an den Graviditätstagen 150, 220 und 240 unter oder knapp über der Nachweisgrenze von 1,8 pmol/g Gewebe, bei dem am 270. Graviditätstag untersuchten Tier lag der Estradiol-17 α -Gehalt im Kotyledonengewebe bei 4,8 pmol/g und im Karunkelgewebe bei 4,2 pmol/g.

Tabelle 16: Konzentrationen von Estradiol-17 β (pmol/g Gewebe) in Kotyledonen- und Karunkelgewebe von Rindern zu unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien. Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}), kleinster Meßwert (Min), größter Meßwert (Max) und Anzahl der untersuchten Tier (n).

Herkunft	Graviditätsdauer	\bar{x}	Min	Max	n
Kotyledonen-gewebehomogenat	150 Tage	5,1	1,2	10,1	3
	220 Tage	3,9	1,8	6,2	3
	240 Tage	8,8	7,3	11,3	3
	270 Tage	19,0	-	-	1
Karunkel-gewebehomogenat	150 Tage	5,8	3,5	10,0	3
	220 Tage	5,5	4,0	6,7	3
	240 Tage	16,2	12,5	22,4	3
	270 Tage	38,3	-	-	1

Tabelle 17: Konzentrationen von Estron (pmol/g Gewebe) in Kotyledonen- und Karunkelgewebe von Rindern zu unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien. Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}), kleinster Meßwert (Min), größter Meßwert (Max) und Anzahl der untersuchten Tier (n).

Herkunft	Graviditätsdauer	\bar{x}	Min	Max	n
Kotyledonen- gewebekomogenat	150 Tage	86	57	115	3
	220 Tage	41	13	55	3
	240 Tage	68	53	75	3
	270 Tage	200	-	-	1
Karunkel- gewebekomogenat	150 Tage	62	47	78	3
	220 Tage	30	11	42	3
	240 Tage	97	68	140	3
	270 Tage	151	-	-	1

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Trennung von Karunkel und Kotyledone: Wegen des histologischen Aufbaus der bovinen Plazentome erscheint es unwahrscheinlich, daß mit den Trophoblastzotten auch Karunkelgewebe entfernt wurde. Dagegen ist es möglich, daß bei der Präparation in geringem Maße Reste von Trophoblastzotten in den Karunkelkrypten verblieben sind. Daher kann angenommen werden, daß die Ergebnisse der an fetalem Plazentomgewebe durchgeführten Untersuchungen die tatsächlichen Enzymaktivitäten widerspiegeln, während die Ergebnisse der Inkubationen von Probenmaterial aus Karunkelgewebe möglicherweise durch die Kontamination mit fetalen Gewebsanteilen beeinträchtigt wurden.

Subzelluläre Fraktionen: Bei der Interpretation der Ergebnisse aus Untersuchungen an subzellulären Fraktionen ist zu berücksichtigen, daß das angewandte Differentialzentrifugationsprotokoll eine relative Anreicherung der untersuchten subzellulären Fraktionen ermöglichte, jedoch keine scharfe Trennung erlaubte. Wie die Untersuchungen der Aktivitäten entsprechender Markerenzyme zeigten, wurde eine relativ saubere Trennung zwischen dem Cytosol einerseits und der Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion andererseits erzielt. Letzere wiesen jedoch in erheblichem Maße untereinander Kreuzkontaminationen auf (Vielemeier, 2000).

Anwendung von Mehrfachbestimmungen: Zur Kontrolle der Testqualität wurden bei den ersten drei Versuchstieren die Homogenatansätze mit einem Vierfachansatz bestimmt. Der Variationskoeffizient lag dabei stets unter 5%, im Durchschnitt bei 1,3%. Wegen diesem geringen Fehler wurde bei den folgenden Kühen die Probenansätze nur noch im Doppelansatz ausgewertet.

Inaktivierung der Steroidsulfatase: Die zum Teil erhöhten Gewebeleerwerte bei den Inkubationsversuchen zur Bestimmung der Aktivität der Steroidsulfatase zeigen die Schwierigkeiten einer ausreichenden Inaktivierung dieses Enzymes. Die Steroidsulfatase ist ein ausgesprochen hitzestabiles Enzym; so liegt das Temperaturoptimum der Neurosteroidsulfatase im Gehirn des Rindes bei über 50°C (Park et al. 1997), das Temperaturoptimum der placentaren Steroidsulfatase des Menschen bei 60°C (Chibbar und Mitchell, 1990). Weiterhin ist sie in der Lage, auch noch bei 0°C, wenn auch in geringer Menge, Estronsulfat zu hydrolysieren. Dies erklärt, daß bei der Bestimmung des endo-

genen Hormongehaltes der bovinen Plazenta fast ausschließlich freie Östrogene gefunden wurden, da die ursprünglich vermutlich überwiegend in konjugierter Form vorliegenden Östrogene im Verlauf der Gewebeaufbereitung und Analyse offensichtlich durch die bei der Zerstörung subzellulärer Strukturen freigesetzte Steroidsulfatase annähernd vollständig hydrolysiert wurden. Bei den Untersuchungen zur Aktivität der Östrogensulfotransferase konnte durch die Supplementierung des Inkubationsmediums mit dem kompetitiven Sulfataseinhibitor 4-Nitrophenylsulfat die Steroidsulfataseaktivität zumindest soweit gehemmt werden, daß deutliche und zeitabhängige Sulfokonjugationen von Östrogenen meßbar waren. Bei den Untersuchungen zur Aktivität der Steroidsulfatase wurde die quantitative Aussagekraft der Ergebnisse teilweise durch erhöhte Gewebeerwerter und v.a. 0-Minutenwerte beeinträchtigt. Die Tatsache, daß die in den Mediumleerwerten gemessenen „Umwandlungsraten“ stets marginal waren, spricht dafür, daß diesen methodischen Problemen eine trotz der scharfen Inaktivierungsbedingungen unvollständige Ausschaltung der Steroidsulfataseaktivität und nicht ein spontaner Zerfall des ^3H -Estronsulfats unter den Testbedingungen zugrunde lag. Trotz dieser Schwierigkeiten war stets ein deutlicher Anstieg des umgewandelten Substrates zwischen dem 0 min Wert und dem 5 min Wert zu beobachten, so daß trotz der bereits in geringen Mengen im Eisbad stattfindenden Hydrolyse von Estronsulfat eine zeitabhängige Substratumwandlung meßbar war.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Steroidhormonkonzentrationen im Blut

Die gemessenen Steroidhormonkonzentrationen im fetalen und maternalen Blut stimmen mit den für die jeweiligen Stadien der Gravidität angegebenen Werten in der Literatur überein (Schams et al., 1972; Challis et al., 1974; Hoffmann et al., 1976; Robertson und King, 1979; Taverne et al., 1986; Hartung, 1995; Hoffmann et al., 1997). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die erhaltenen Ergebnisse an Tieren mit ungestörter Gravidität und Plazentafunktionen erarbeitet wurden. Weiterhin zeigen die Ergebnisse der Progesteronbestimmungen bei den am 270. Graviditätstag untersuchten Kühen, daß bei keinem dieser Tiere der präpartale Progesteronabfall eingetreten war.

5.2.2 Abhängigkeit der Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und Steroidsulfatase vom Trächtigkeitsstadium sowie Veränderungen der Enzymaktivitäten unter der Geburt

Sowohl bezüglich der Östrogensulfotransferase als auch der Steroidsulfatase ergaben sich vom 150. bis zum 270. Graviditätstag keine signifikanten Veränderungen. Unter der Geburt ist die Östrogensulfotransferase im Karunkelgewebe in gegenüber der Trächtigkeit unverändert hoher Aktivität nachweisbar. Im Kotyledonengewebe sinkt sie im Mittel auf ca. 60% der in der vorangegangenen Trächtigkeitsphase gemessenen Werte ab, aufgrund der hohen Streuung innerhalb der Geburtsgruppe erwies sich dieser Abfall jedoch nicht als statistisch signifikant. Betrachtet man sich die einzelnen Tiere dieser Gruppe, unterscheiden sich die Werte von 2 Tieren kaum von denen der am 270. Tag untersuchten Tiere. Bei einem der beiden anderen Tiere waren die gemessenen Umwandlungsraten um ca. ein Drittel niedriger, und beim vierten Tier war kein zeitlicher Anstieg der Umwandlungsraten nachweisbar. Die starke Streuung der Meßwerte spricht dafür, daß es in der Kotyledone unter der Geburt zu einem starken Abfall der Östrogensulfotransferaseaktivität kommt, wobei bei zwei der vier untersuchten Tieren dieser Abfall offensichtlich noch nicht eingetreten war.

Bezüglich der Steroidsulfatase war unter der Geburt sowohl im fetalen als auch im maternalen Anteil der Plazentome ein signifikanter Abfall der Enzymaktivität zu verzeichnen, wobei die Umwandlungsraten im Karunkelgewebe deutlich stärker streuten als im Kotyledonengewebe. Dies deutet darauf hin, daß der Abfall im Karunkelgewebe einen Prozeß darstellt, welcher zur Geburt noch in vollem Gang und bei einem Teil der Tiere noch nicht abgeschlossen war. Der Nachweis eines Aktivitätsabfalls der Steroidsulfatase in den Kotyledonen steht im Widerspruch zu den von Janszen et al. (1995) erarbeiteten Ergebnissen, nach denen es in der Spätphase der Gravidität zwischen dem 262. Graviditätstag und der Geburt zu einem erheblichen Anstieg der Steroidsulfataseaktivität kommt, welcher die Grundlage für den steilen präpartalen Anstieg der freien Östrogene darstellen soll. Die eigenen Ergebnisse sprechen jedoch dafür, daß dem steilen präpartalen Anstieg der freien Östrogene eher eine gesteigerte de-novo Synthese und Überlastung der Östrogensulfotransferaseaktivität als eine Mobilisierung im fetalen Kompartiment sequestrierter und durch vermehrte Hydrolyse aktivierter Östrogene zugrunde liegt.

5.2.3 Verteilung der Aktivitäten von Östrogensulfotransferase und Steroidsulfatase zwischen Karunkel- und Kotyledonengewebe

Die in der Literatur (Mattioli et al., 1984; Möstl et al., 1986) aus punktuellen Untersuchungen bekannte Verteilung der Östrogensulfotransferase und der Steroidsulfatase, nach der die Östrogensulfotransferase stärker im fetalen Teil der Plazentome, die Steroidsulfatase vermehrt im maternalen Teil vorkommt, konnte für die gesamte zweite Hälfte der Gravidität bestätigt werden. Die Tatsache, daß die Präparationen aus Kotyledonengewebe als frei von Kontaminationen maternaler Gewebsanteile angesehen werden können, spricht dafür, daß im Kotyledonengewebe tatsächlich hohe Östrogensulfotransferase- und Steroidsulfataseaktivitäten vorhanden sind. Bezüglich der an Untersuchung von Karunkelgewebe gewonnenen Ergebnisse herrscht diesbezüglich aufgrund der Kontamination an nicht entfernbaren Chorionzotten eine gewisse Unsicherheit.

Die Tatsache, daß die Steroidsulfataseaktivität in den Karunkelpräparationen stets deutlich höher war als in den entsprechenden Kotyledonenpräparationen, spricht eindeutig für eine starke Expression der Steroidsulfatase im maternalen Teil der Plazentome. Es ist jedoch offen, inwieweit die in den Karunkelpräparationen gemessenen schwächeren Östrogensulfotransferaseaktivitäten auf Kontaminationen dieser Präparationen mit verbliebenen Chorionzotten zurückzuführen sind. Da das für die Versuche gewonnene Karunkelgewebe durch tangentialen Scherenschnitte von der Karunkeloberfläche gewonnen wurde, also Bereichen, in denen eine sehr geringe Verzahnung mit kleinen Zotten vorhanden ist, und das Freisein von großen Zotten kontrolliert werden konnte, kann die Kontamination mit fetalem Gewebe jedoch als gering eingeschätzt werden. Die erhaltenen Befunde sprechen daher insgesamt für eine Expression der Östrogensulfotransferase auch im maternalen Teil der Plazentome.

5.2.4 Subzelluläre Verteilung der Enzymaktivität

Sowohl in den Karunkeln als auch in den Kotyledonen wurde die Östrogensulfotransferaseaktivität fast ausschließlich im Cytosol nachgewiesen. Dies stimmt mit Untersuchungen an diversen humanen Geweben (Leber, Gehirn, Thrombozyten, Nebenniere, Jejunum, Mammaepithelzellen, Endometrium) überein, nach denen die Östrogensulfotransferaseaktivität ebenfalls mit dem Cytosol assoziiert war (Her et al., 1996; Falany,

1997).

Die Steroidsulfataseaktivität war in der Mitochondrien- und der Mikrosomenfraktion am höchsten, ferner wurde im maternalen Gewebe noch eine deutliche Steroidsulfataseaktivität in der Kernfraktion gefunden. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich bei der placentaren Steroidsulfatase des Rindes um ein membrangebundenes Enzym handelt, ähnlich der Steroidsulfatase in der Plazenta des Menschen. In der humanen Plazenta ist die Steroidsulfatase gebunden an Kernmembran, rauhes endoplasmatisches Retikulum, Plasmamembran, Endosome und multivesikuläre Körper (Dibbelt et al., 1989). Auch in den humanen Fibroblasten ist die Steroidsulfatase membrangebunden im rauhen endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Zysternen, Trans-Golgi-Netz, Plasmamembran und den Endozyten (Willemsen et al., 1988). In der Leber der Ratte handelt es sich bei der Steroidsulfatase um ein transmembranöses Protein, dessen aktives Ende an der Außenseite der mikrosomalen Vesikel sitzt (Moriyasu und Ito, 1982). Die Abhängigkeit der subzellulären Verteilung der Steroidsulfataseaktivität von der Gewebeherkunft könnte mit der Präparation der unterschiedlich festen Gewebe zusammenhängen. Das weichere Kotyledonengewebe ließ sich leichter und gründlicher im Potter in seine subzellulären Bestandteile aufschließen als das festere Karunkelgewebe, so daß im Karunkelgewebe evtl. mehr größere Zellfragmente und komplette Zellen verblieben, was die im maternalen Gewebe höhere Steroidsulfataseaktivität in der Kernfraktion und im fetalen Gewebe höhere Steroidsulfataseaktivität im Cytosol erklärt. In der Plazenta des Menschen wurde eine lösliche Steroidsulfatase im Zellkern gefunden, welche Estronsulfat hydrolysiert (Gniot-Szulzycka und Drywa, 1994).

5.2.5 Substratspezifität der Enzyme

Die Östrogensulfotransferase in der Plazenta des Rindes wies, wie von Adams und Low (1974) beschrieben, eine hohe Substratspezifität für Östrogene auf. Ergebnisse der Untersuchungen von Holcenberg und Rosen (1965), in denen ebenfalls eine Sulfatierung von Dehydroepiandrosteron beobachtet wurde, konnten nicht bestätigt werden. Auch Testosteron und Pregnenolon wurden in eigenen Untersuchungen nicht sulfatiert.

Neben der Hydrolyse von Estronsulfat konnte auch eine Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat in der Plazenta des Rindes nachgewiesen werden. Diese Hydrolyse ließ sich nicht durch einen 10000 fachen Überschuß an Estronsulfat hemmen. Aus die-

sen Ergebnissen geht nicht eindeutig hervor, ob es sich bei der Hydrolyse von Estronsulfat und der Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat um ein oder zwei Enzyme handelt. Es bleibt daher eine ähnliche Unsicherheit wie beim Menschen (Noel et al., 1983; Dibbelt und Kuss, 1984; Milewich und Porter, 1987; Vaccaro et al., 1987).

5.2.6 Enzymaktivität im Myometrium

Da bei einem Teil der Tiere eine deutliche myometriale Östrogensulfotransferaseaktivität nachweisbar ist, kann das Myometrium neben der Plazenta ebenfalls als Ort der Sulfokonjugation plazentarer Östrogene angesehen werden. Vermutlich besteht während der Gravidität die Funktion der Östrogensulfotransferase im Myometrium darin, eine östrogene Überstimulation der Gebärmutter zu verhindern und stellt somit einen Schutzmechanismus dar.

Eine eindeutige Aussage hinsichtlich eines Zusammenhanges zwischen der Östrogensulfotransferaseaktivität im Myometrium und dem Graviditätsstadium bzw. der Probenentnahme in Längs- oder Ringmuskulatur kann aufgrund des geringen Stichprobenumfanges nicht getroffen werden. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Steroidsulfataseaktivität im Myometrium deuten an, daß zwischen dem 150. und 270. Graviditätstag auch im Myometrium eine Steroidsulfatase vorhanden ist, diese jedoch relativ schwach exprimiert wird oder nur in einem Teil der Zellen zu finden ist.

Dies läßt darauf schließen, daß – anders als beim Schaf (Rossier und Pierrepont, 1974) – beim Rind konjugierte Östrogene für die Vermittlung evtl. östrogenen Wirkungen auf das Myometrium während der Gravidität eher von untergeordneter Bedeutung sind. Trotzdem läßt dieser Befund den östrogenresponsiven Charakter des Myometriums beim graviden Rind erkennen, da nur in östrogenresponsiven Zellen die Regulation der Konzentrationen intrazellulärer freier Östrogene erforderlich erscheint.

5.2.7 Enzymaktivität im Corpus luteum

Sowohl in den zyklischen als auch in den Graviditätsgelbkörpern wurde eine hohe Steroidsulfataseaktivität nachgewiesen, während die Sulfatierung von Östrogenen nicht beobachtet wurde. Das Fehlen einer Östrogensulfotransferaseaktivität spricht gegen eine Östrogenempfindlichkeit des C.l. graviditatis und somit gegen eine Rolle plazentarer

Östrogene als Überträger eventueller Signale zwischen Plazenta und C.I. graviditatis. Offensichtlich besteht daher die Aufgabe der Steroidsulfatase dort in der Hydrolyse von sulfatierten Präkursoren der Progesteronbiosynthese, eine Funktion, die auch für die Steroidsulfataseaktivität zyklischer Gelbkörper postuliert werden kann.

5.3 Interpretation der Ergebnisse aus funktioneller Sicht

5.3.1 Mögliche Funktionen der Östrogensulfotransferase in der Plazenta des Rindes

Im fetalen Trophoblasten könnte die Östrogensulfotransferase zum Schutz eventuell vorhandener Östrogen-sensitiver Zellen vor einer östrogenen Überstimulation dienen. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die im fetalen Trophoblasten in so großen Mengen gebildeten sulfokonjugierten Östrogene ein primäres Syntheseprodukt sind. Die Sulfo-konjugation bewirkt, daß nicht alle östrogenempfindlichen Zellen Zielzellen sind, sondern nur solche, welche neben Östrogenrezeptoren auch mit einer Steroidsulfatase ausgestattet sind. So können in einem Teil der östrogenresponsiven Zellen während der Gravidität unerwünschte Östrogenwirkungen vermieden werden.

Die im Karunkelgewebe nachgewiesene Östrogensulfotransferaseaktivität könnte einmal auf Kontamination mit fetalen Anteilen der Plazenta (siehe Abschnitt 5.1) zurückgeführt werden, dagegen spricht jedoch die Höhe der Östrogensulfotransferaseaktivität im maternalen Gewebe. Wahrscheinlicher ist, daß die Sulfokonjugation der Östrogene im Karunkelgewebe einen Schutzmechanismus für die dort eventuell vorhandenen potentiellen Zielzellen darstellt oder einen zusätzlichen Schutzwall gegen eine Überschwemmung des maternalen Gewebes mit freien Östrogenen bildet.

5.3.2 Mögliche Funktionen der Steroidsulfatase in der Plazenta des Rindes

Die Steroidsulfatase könnte im Trophoblastgewebe bzw. im Karunkelgewebe die Nutzung sulfokonjugierter Präkursoren aus dem fetalen und / oder maternalen Kompartiment ermöglichen. So wird das zur Steroidbiosynthese in den endokrinen Organe nötige Cholesterin nicht nur aus den in den Lipidgranula des Cytosols gespeicherten Cholesterinestern sondern auch aus Cholesterinsulfat gewonnen, welches wiederum zunächst

durch Hydrolyse bereitgestellt werden muß (Bamberg, 1994b). Eine weitere mögliche Funktion wäre die „Nutzung“ der konjugierten Östrogene über den Sulfatase-Pathway. Wahrscheinlich ist, daß die Sulfokonjugation der plazentaren Östrogene bereits im Trophoblasten stattfindet, und die konjugierten Östrogene über den Sulfatase-Pathway im Karunkelgewebe aktiviert werden, um dort als lokale Mediatoren zu wirken.

6 Zusammenfassung

In der Plazenta des Rindes werden während der Gravidität große Mengen rezeptorinaktiver, sulfokonjugierter Östrogene gebildet, deren biologische Funktion bisher unbekannt ist. Für die Aktivierung und Inaktivierung dieser Östrogene sind zwei Enzyme von Bedeutung: die Steroidsulfatase aktiviert die sulfokonjugierten Östrogene durch Hydrolyse, während die Östrogensulfotransferase die freien Östrogene durch Sulfokonjugation inaktiviert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Verteilung der Östrogensulfotransferaseaktivität (STA) bzw. Steroidsulfataseaktivität (SA) auf Karunkel- und Kotyledonengewebe zu untersuchen, sowie ein Aktivitätsprofil dieser beiden Enzyme in der zweiten Trächtigkeitshälfte und unter der Geburt zu erstellen. Ferner wurden die subzelluläre Lokalisation bestimmt sowie Anhaltspunkte zur Substratspezifität der Östrogensulfotransferase und Steroidsulfatase erhalten. Ergänzend wurde die STA bzw. SA im Myometrium als möglichem Zielorgan untersucht, und die Plazenta mit dem Corpus luteum, als einem anderen steroidogenen Organ, hinsichtlich der Exprimierung dieser beiden Enzyme verglichen.

Die Untersuchungen wurden an Homogenaten aus Trophoblast- und Karunkelgewebe von 150 (n=4), 220 (n=4), 240 (n=3) und 270 (n=3) Tage tragenden Kühen sowie Geburtstieren (n=4) unter Zugabe von radioaktiv markiertem Estron bzw. Estronsulfat durchgeführt. Weiterhin wurde die Umwandlung von radioaktiv markiertem Estron bzw. Estronsulfat in Homogenaten aus der Ring- bzw. Längsmuskelschicht entstammendem Myometriums-gewebe (Tag 150: n=3, Tag 240: n=2, Tag 270: n=1) und aus Gesamtmyometrium (Tag 220: n=2, Tag 240 und 270: n=1) sowie aus Corpus luteum Gewebe von graviden (n=8) und ingraviden (n=4) Kühen bestimmt. Ferner wurden subzelluläre Fraktionen aus Trophoblast- und Karunkelgewebe von 150 (n=4), 220 (n=4), 240 (n=3) und 270 (n=3) Tage tragenden Kühen mit radioaktiv markiertem Estron bzw. Estronsulfat inkubiert, und die Substratspezifität der Enzyme mit äquimolaren Mengen an radioaktiv markiertem Estron, Estradiol-17 β , Estradiol-17 α , Dehydroepiandrosteron oder Testosteron bzw Estronsulfat oder Dehydroepiandrosteronsulfat getestet.

Die Sulfokonjugation von Estron erfolgte sowohl im Trophoblast- als auch im Karun-

kelgewebe der untersuchten Tiere unabhängig vom Trächtigkeitsstadium. Im Trophoblastgewebe wurde signifikant ($p < 0,001$) mehr Estron sulfokonjugiert als im Karunkelgewebe. Unter der Geburt kommt es zu einem Abfall der STA im Kotyledonengewebe. Übereinstimmend fand die Sulfokonjugation sowohl im fetalen als auch im maternalen Anteil der Plazenta fast ausschließlich im Cytosol statt. Es wurden Estron, Estradiol-17 β und Estradiol-17 α jedoch weder Dehydroepiandrosteron noch Testosteron sulfokonjugiert.

Die Hydrolyse von Estronsulfat war zu den untersuchten Trächtigkeitszeitpunkten konstant. Unter der Geburt kam es sowohl im Kotyledonen- als auch im Karunkelgewebe zu einem signifikanten Abfall der SA. Im Karunkelgewebe wurde signifikant ($p < 0,001$) mehr Estronsulfat hydrolysiert als im Trophoblastgewebe. Die Hydrolyse fand sowohl im fetalen als auch im maternalen Anteil der Plazenta vor allem in der Mitochondrien-, Mikrosomen- und Kernfraktion statt, im Cytosol wurde kaum eine Hydrolyse von Estronsulfat beobachtet. Es wurden sowohl Estronsulfat als auch Dehydroepiandrosteronsulfat hydrolysiert, wobei die Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat durch einen bis zu 10000fachen Überschuß von Estronsulfat nicht gehemmt wurde.

In beiden untersuchten Schichten des Myometriums konnte zum Teil eine deutliche Sulfokonjugation von Estron und in geringerem Maße auch eine Hydrolyse von Estronsulfat beobachtet werden. In Corporae luteae cyclicae und graviditates wurde eine deutliche Hydrolyse von Estronsulfat aber kaum eine Sulfokonjugation von Estron gemessen.

Die Untersuchungen zeigen, daß die Sulfokonjugation von Östrogenen vor allem im Trophoblastgewebe erfolgt, während die Hydrolyse von Estronsulfat vorwiegend im Karunkelgewebe stattfindet. Die plazentaren Östrogene verlassen die Kotyledone bereits in sulfokonjugierter Form, könnten daher entweder einen autokrinen Faktor oder eine inaktive Transportform darstellen. Es wurde kein Anstieg sondern ein Abfall der SA unter der Geburt beobachtet, die unmittelbar ante partum vermehrt auftretenden freien Östrogene im peripheren Plasma des Rindes scheinen daher aus einer Überlastung der Östrogensulfotransferase zu resultieren. Die hohe SA im Karunkelgewebe deutet darauf hin, daß es sich hierbei um ein mögliches Zielorgan der konjugierten Östrogene handeln könnte. Die Östrogensulfotransferase weist eine hohe Substratspezifität für Östrogene auf. Die Ergebnisse der Untersuchungen hinsichtlich der Substratspezifität der plazentaren Steroidsulfatase des Rindes lassen keinen eindeutigen Schluß zu, es wird neben

Estronsulfat auch Dehydroepiandrosteronsulfat in der Plazenta des Rindes hydrolysiert, es ist aber unsicher ob von dem selben oder unterschiedlichen Enzymen.

7 Summary

The biological function of large amounts of receptor inactive sulfoconjugated estrogens produced during pregnancy in cattle is largely unknown. Activation and inactivation of estrogens is controlled by two enzymes, steroidsulfatase (S) and estrogensulfotransferase (ST). The present work investigates the activity of both enzymes in caruncular and cotyledonary tissue and establishes an activity profile during the second half of pregnancy and parturition. Furthermore the subcellular distribution of steroidsulfatase activity (SA) and estrogensulfotransferase activity (STA) was investigated as well as their substrate specificity. In addition STA and SA were determined in the myometrium as a likely target organ of the sulfatase pathway and in the steroidogenic organ „corpus luteum“.

The investigation was performed with homogenates from trophoblast- and caruncular tissue of cows being pregnant 150 (n=4), 220 (n=4), 240 (n=3) and 270 (n=3) days respectively and parturient animals (n=4) using radio-labelled estrone and estrone sulfate as substrate. Substrate conversion was estimated in circular and longitudinal myometrial muscles of pregnant cows (day 150, n=3; day 240, n=2; day 270, n=1 of pregnancy) in total myometrium (day 220, n=2; day 240, n=1; day 270, n=1 of pregnancy) and in corpora lutea of pregnant (n=8) and non-pregnant (n=4) cows. Similarly subcellular fractions from trophoblast and caruncular tissue of 150 (n=4), 220 (n=4), 240 (n=3) and 270 (n=3) pregnant cows were incubated with radio-labelled estrone and estronesulfate. To test for substrate specificity of ST and S respectively, equimolar concentrations of radio-labelled estrone, estradiol-17 β , estradiol-17 α , dehydroepiandrosterone, testosterone and estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate, were used as substrates.

Sulfoconjugation of estrone was observed in trophoblastic and caruncular tissue without showing any relation to the state of gestation. There was a significant higher ($p<0.001$) sulfoconjugation in the trophoblast compared to caruncular tissue. At parturition a decrease of STA was observed. In both, the fetal and maternal part of the placentome, sulfoconjugation occurred only in the cytosolic fraction. Estrone, estradiol-17 β and estradiol-17 α were sulfoconjugated, while dehydroepiandrosterone and testosterone were not. Hydrolysis of estrone sulfate was independent of the stage of pregnancy. However, SA decreased at parturition in caruncular and cotyledonary tissue. SA was higher

($p < 0.001$) in caruncular tissue than in the trophoblast. In respect to subcellular fractions SA in both the maternal and fetal compartment was mainly associated with the microsomal, mitochondrial and nuclear fraction, there was hardly any enzyme activity detected within the cytosolic fraction. Both estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate were hydrolyzed and hydrolysis of dehydroepiandrosterone sulfate was not affected by a 10000 fold excess of estrone sulfate.

In all myometrium layers a distinct sulfoconjugation of estrone could be demonstrated, as well as a weak hydrolysis of estrone sulfate. In the corpora lutea graviditatis and cyclicae a distinct hydrolysis of estrone sulfate but no sulfoconjugation of estrone were observed.

The results clearly demonstrate that sulfoconjugation of estrogens primarily occurs in the trophoblast while hydrolysis of estrone sulfate is primarily observed in caruncular tissue. Placental estrogens are released from the cotyledonary tissue (trophoblast) in conjugated form and might either be considered as an autocrine regulatory factor or an ineffective transport form. The observed increase of free estrogens in peripheral plasma prior to parturition is probably due to the lack of STA and not due to an increased hydrolysis, because of the lower SA found at parturition. The high SA in caruncular tissue indicates that caruncular cells are a likely target organ for initially conjugated estrogens. STA shows a higher substrate specificity for estrogens while the results obtained for the specificity of bovine placental SA do not allow final conclusion.

8 Literaturverzeichnis

Adams J.B. (1991):

Enzymic synthesis of steroid sulphates. XVII. On the structure of bovine estrogen sulphotransferase.
Biochimica et Biophysica Acta 1076, 282-288

Adams J.B., Low J. (1974):

Enzymic synthesis of steroid sulfates. X. Isolation of oestrogen sulphotransferase from bovine placenta and comparison of its properties with adrenal oestrogen sulphotransferase.
Biochimica et Biophysica Acta 370, 189-196

Adams J.B., Ellyard R.K., Low J. (1974):

Enzymatic synthesis of steroid sulphates. IX. Physical and chemical properties of purified oestrogen sulphotransferase from bovine adrenal glands, the nature of its isoenzyme forms and a proposed model to explain its wave-like kinetics.
Biochimica et Biophysica Acta 370, 160-188

Adiani S. (1995):

Etablierung eines in vitro-Testsystems zur gleichzeitigen Darstellung der Aktivität von 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und Aromatase in der Plazenta des Rindes.
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Agthe O., Kolm H.P. (1975):

Oestrogen and progesterone levels in the blood plasma of cows with normal parturition or with a retained placenta.
Journal of Reproduction and Fertility 43, 163-166

Aksoy I.A., Wood T.C., Weinshilboum R. (1994):

Human liver estrogen sulfotransferase: identification by cDNA cloning and expression.
Biochemical and Biophysical Research Communications 200, 1621-1629

Albrecht E.D. (1980):

A role for estrogen in progesterone production during baboon pregnancy.
American Journal of Obstetrics and Gynecology 136, 569-574

Albrecht E.D., Pepe G.J. (1984):

Effect of the antiestrogen ethamoxytriphetol (MER-25) and luteotomy on serum progesterone concentrations in pregnant baboons.
Endocrinology 115, 1717-1721

Albrecht E.D., Pepe G.J. (1990):

Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy.
Endocrine Reviews 11(1), 124-150

Albrecht E.D., Henson M.C., Pepe G.J. (1991):

Regulation of placental low lipoprotein uptake in baboons by estrogen.
Endocrinology 128, 450-458

Alexandrova M., Soloff M.S. (1980):

Oxytocin receptors and parturition. I. Control of oxytocin receptor concentration in the rat myometrium at term.
Endocrinology 106, 730

Anderson E., Howell A. (1995):

Oestrogen sulphotransferases in malignant and normal human breast tissue.
Endocrine Related Cancer 2, 227-233

Aronica S.M., Katzenellenbogen B.S. (1993):

Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors.

Endocrinology 128(4), 2045-2052

Bamberg E. (1994a):

Chemie, Biochemie und Nachweis der Steroidhormone: Biochemie

in Döcke F. (ed.), Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Auflage: 31-37

Bamberg E. (1994b):

Keimdrüsen: Biochemie der gonadalen Steroide

In: Döcke F. (ed.), Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Auflage: 411-418

Bartlett N.R., Hobkirk R. (1991):

Estrogen sulfotransferase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities in guinea pig chorion through gestation.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 38, 241-247

Batra S. (1986):

Effect of estrogen and progesterone treatment on calcium uptake by the myometrium and smooth muscle of the lower urinary tract.

European Journal of Pharmacology 127, 37-42

Ben-David E., Shemesh M. (1990):

Ultrastructural localization of cytochrome P-450_{scc} in the bovine placenta using protein A-gold technique.

Biology of Reproduction 42(1), 131-138

Benedetto M.T., Tabanelli S., Gurpide E. (1990):

Estrone sulfate sulfatase activity is increased during in vitro decidualisation of stromal cells from human endometrium.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 70(2), 342-345

Bergner E.A., Shapiro L.J. (1981):

Increased cholesterol sulfate in plasma and red blood cell membranes of steroid sulfatase deficient patients.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 53, 221-223

Bernier F., Leblanc G., Labrie F., Luu-The V. (1994a):

Structure of human estrogen and aryl sulfotransferase gene. Two mRNA species issued from a single gene.

Journal of Steroid Biochemistry 269(45), 28200-28205

Bernier F., Lopez Solache I., Labrie F., Luu-The V. (1994b):

Cloning and expression of cDNA encoding human placental estrogen sulfotransferase.

Molecular Cell Endocrinology 99(1), R11-R15

Bhavnani B.R. (1998):

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of conjugated equine estrogens: chemistry and metabolism.

Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 217(1), 6-16

Bonifas J.M., Morley B.J., Oakey R.E., Wai Kan Yuet (1987):

Cloning of a cDNA for steroid sulfatase: frequent occurrence of gene deletions in patients with recessive X chromosome-linked ichthyosis.

Proceedings of the National Academy of Science of the USA 84, 9248-9251

Borthwick E.B., Burchel A., Coughtrie W.H. (1993):

Purification and immunochemical characterisation of a male-specific rat liver oestrogen sulphotransferase.
Biochemistry Journal 289, 719-725

Bradford M. (1976):

A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding.
Analytical Biochemistry 72, 248-254

Bresciani F. (1968):

Topographie of DNA synthesis in the mammary gland of the C3H mouse and its control by ovarian hormones: an autoradiographic study.
Cell Tissue Kinetics 1, 51-63

Brooks S.C., Battelli M.G., Corombos J.D. (1987):

Endocrine steroid sulfotransferases: porcine endometrial estrogen sulfotransferase.
Journal of Steroid Biochemistry 26, 285-290

Buirchell B.J., Hähnel R. (1975):

Metabolism of Estradiol-17 β in human endometrium during the menstrual cycle.
Journal of Steroid Biochemistry 6, 1489-1494

Challis J.R.G., Kim C.K., Naftolin F., Judd H.L., Yen S.S.C., Benirschke K. (1974):

The concentrations of androgens, oestrogens, progesterone and luteinizing hormone in the serum of foetal calves throughout the course of gestation.
Journal of Endocrinology 60, 107-115

Challis J.R.G., Greenblatt E. (1980):

Metabolism of ^3H -oestrone sulphate by fetal membranes, placenta and uterine tissues from pregnant rabbits.
Journal of Reproduction and Fertility 58, 13-18

Challis J.R.G., Lye S.L. (1994):

Parturition.
in: Knobil E., Neill J.D. (eds) The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, vol 2, 985-1031

Chang P.L., Varey P.A., Rosa N.E., Ameen M., Davidson R.G. (1986):

Association of steroid sulfatase with one of the arylsulfatase C isozymes in human fibroblasts.
Journal of Steroid Biochemistry 261(21), 14443-14447

Chang P.L., Mueller O.T., Lafrenie R.M., Varey P.A., Rosa N.E., Davidson R.G., Henry W.M., Shows T.B. (1990):

The human arylsulfatase-C isoenzymes: two distinct genes that escape from X inactivation.
American Journal of Human Genetics 46(4), 729-737

Chew B.P., Keller H.F., Erb R.E., Malven P.V. (1977):

Periparturient concentrations of prolactin, progesterone and the estrogens in blood plasma of cows retaining and not retaining fetal membranes.
Journal of Animal Science 44(6), 1055-1060

Chibbar R., Mitchel B.F. (1990):

Steroid Sulfohydrolase in human chorion and decidua: studies using pregnenolone sulfate and dehydro-epiandrosterone sulfate as substrate.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 70(6), 1693-1701

Chibbar R., Wong S., Miller F.D., Mitchel B.F. (1995):

Estrogen stimulates oxytocin gene expression in human choriodecidua.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80(2), 567-72

Clarke C., Thorburn P., McDonald D., Adams J.B. (1982a):

Enzymic synthesis of steroid sulfates. Structural domains of oestrogen sulfotransferase.
Biochimica et Biophysica Acta 707, 28-37

Clarke C.L., Adams J.B., Wren B.G. (1982b):

Induction of estrogen sulfotransferase in human endometrium by progesterone in organ culture.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 55, 70-75

Conly P.W., Le Maire W.J., Monkus E.F., Cleveland W.W. (1973):

Plasma estriol concentration in infants with the respiratory distress syndrome.
Journal of Pediatrics 83, 851-853

Currie W.B., Cox R.J., Thorburn G.D. (1976):

Release of prostaglandin F, regression of corpora lutea and induction of premature parturition in goats treated with oestradiol-17 β .
Prostaglandins 12, 1093-1103

Daiter E., Pampfer S., Yeung Y.G., Barad D., Stanley E.R., Pollard J.W. (1992):

Expression of colony stimulating factor-1 in the human uterus and placenta.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 74, 850-858

Daniel W.L. (1985):

Arylsulfatase C and the steroid sulfatases.
Isozymes: Current Topics of Biological and Medical Research 12, 189-228

Daniel W.L., Chang P.L. (1990):

Comparison of arylsulfatase C and steroid sulfatase from human placenta and liver.
Enzyme 43(4), 212-222

Davidson I.A., Scott J.E., Longstaff A., Abramovich D.R. (1983):

Oestrogen conjugation in mid trimester human fetal brain: a possible role in its sexual differentiation.
Journal of Steroid Biochemistry 18, 525-529

Demyan W.F., Song C.S., Kim D.S., Her S., Gallwitz W., Rao T.R., Slomczynska M., Chatterjee B., Roy A.K. (1992):

Estrogen sulfotransferase of the rat liver: complementary DNA cloning and age- and sex-specific regulation of messenger RNA.
Molecular Endocrinology 6, 589-597

Dibbelt L., Kuss E. (1983):

Human placental steroid-sulfatase: Kinetics of the in-vitro hydrolysis of dehydroepiandrosterone 3-sulfate and of 6 α -hydroxyepiandrosterone 3-sulfate.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 364, 187-191

Dibbelt L., Kuss E. (1984):

Human placental steroid sulfatase solubilized with a cholic acid derivate: molecular mass, kinetic properties and susceptibility to glycosidases.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 365, 1145-1153

Dibbelt L., Herzog V., Kuss E. (1989):

Human placental sterolsulfatase: Immunocytochemical and biochemical localisation.
Biological Chemistry Hoppe-Seyler 370, 1093-1102

Dibbelt L., Kuss E. (1991):

Human placental sterolsulfatase: interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state analogues, amino-acid modifiers and anion transport inhibitors.
Biological Chemistry Hoppe-Seyler 372, 173-185

Diczfalusy E. (1969):

Steroid metabolism in the human foeto-placental unit.
Acta Endocrinologica (Copenh) 61(4), 649-664

Dijkstra A.C., Vermeesch-Markslag A.M., Vromans E.W., Happle R., van de Kerkhof P.C., Zwanenburg B., Vos F., Vermorken A.J. (1987):

Substrate specific sulfatase activity from hair follicles in recessive X-linked ichthyosis.
Acta Dermologica et Venereologica 67(5), 369-376

Dixon W.J. (1993):

BMDP Statistical Software Manual Volume 1 and 2
University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

Dodgson K.S., Rose F.A. (1975):

Sulfohydrolases.
In: *Metabolic Pathways* (Greenberg D.M., ed.), 3rd edn. Vol. 7, 359-431, Academic Press, New York

Dolly J.O., Dodgson K.S., Rose F.A. (1972):

Studies on the oestrogen sulphatase and arylsulphatase C activities of rat liver.
Biochemical Journal 128, 337-345

Duval D., Durant S., Homo-Delarche F. (1983):

Non-genomic effects of steroids. Interaction of steroid molecules with membrane structures and functions.
Biochimica et Biophysica Acta 737, 409-442

Dwyer R.J., Robertson H.A. (1980):

Oestrogen sulphatase and sulphotransferase activities in the endometrium of the sow and ewe during pregnancy.
Journal of Reproduction and Fertility 60, 187-191

Elias P.M., Williams M.L., Maloney M.E., Bonifas J.A., Brown B.E., Grayson S., Epstein E.H. (1984):

Stratum corneum lipids in disorders of cornification: steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis.
Journal of Clinical Investigation 74, 1414-1421

Epstein E.H.Jr., Krauss R.M., Shackleton C.H.L. (1981):

X-linked ichthyosis: increased blood cholesterol sulfate and electrophoretic mobility of low-density lipoprotein.
Science 214, 659-660

Evans L.E., Wagner W.C. (1976):

Bovine plasma oestrogens, progesterone and glucocorticoids during dexamethasone induced parturition.
Acta Endocrinologica 81, 385-397

Evans G., Wagner W.C. (1981):

In vitro oestrogen synthesis by bovine placenta during pregnancy and induced parturition.
Acta Endocrinologica 98, 119-125

Evans T.R.J., Rowlands M.G., Jarman M. Coombes R.C. (1991):

Inhibition of estrone sulfatase enzyme in human placenta and human breast carcinoma.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 39, 493-499

Fairclough R.J., Hunter J.T., Welch R.A.S., Peterson A.J. (1992):

The role of oestrogen in the initiation of parturition in the cow.
Proceedings of the 12th international congress on animal reproduction 2, 178-312, free communications

Falany C.N. (1997):

Enzymology of human cytosolic Sulfotransferases.
FASEB Journal 11(4), 206-216

Falany J.L., Falany C.N. (1996):

Regulation of estrogen sulfotransferase in human endometrial adenocarcinoma cells by progesterone.
Endocrinology 137(4), 1395-1401

Farhat M.Y., Abi-Younes S., Ramwell P.W. (1996):

Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall.
Biochemical Pharmacology 51, 571-576

Farooqui A.A. (1987):

Clinical and metabolic aspects of sulfohydrolase.
Advances in Clinical Chemistry 26, 157-201

Flint A.P.F., Rickets A.P., Craig V.A. (1979):

The control of placental steroid synthesis at parturition in domestic animals.
Animal Reproduction Science 2, 239-251

Fluharty A.L., Stevens R.L., Fung D., Peak S., Kihara H. (1975):

Uridine diphospho-N-acetylgalactosamine-4-Sulfate sulfohydrolase activity of human arylsulfatase B and its deficiency in the maroteaux-lamy syndrome.
Biochemical and Biophysical Research Communications 64, 955-962

Freeman D.J., Saidi F., Hobkirk R. (1983):

Estrogen sulfotransferase activity in guinea pig uterus and chorion.
Journal of Steroid Biochemistry 18, 23-27

Fuchs A.R., Periyasamy S., Alexandrova M., Soloff M.S. (1983):

Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids.
Endocrinology 113, 742-749

Gant N.F., Milewich L., Calvert M.E., MacDonald P.C. (1977):

Steroid sulfatase activity in human fetal membranes.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 45, 965-972

Garfield R.E., Kannon M.S., Daniel E.E., et al. (1980):

Gap junction formation in myometrium: Control by estrogens, progesterone and prostaglandins.
American Journal of Physiology 238, C81-89

Gee K.W., McCauley L.D., Lan N.C. (1995):

A putative receptor for neurosteroids on the GABAA receptor complex: the pharmacological properties and therapeutic potential of epalons.
Critical Reviews in Neurobiology 9, 207-227

Gentz F. (1994):

Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Gravidität der Stute.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gerres S. (1991):

Untersuchungen zur Bedeutung von Progesteron als Regelfaktor bei der Entstehung der Pseudogravidität der Hündin.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gibori G., Chen Y.D., Khan I., Azhar S., Reaven G.M. (1984):

Regulation of luteal cell lipoprotein receptors, sterol contents, and steroidogenesis by estradiol in the pregnant rat.
Endocrinology 114, 609-617

Glutek S.M., Hobkirk R. (1990):

Estrogen sulfatase and steroid sulfatase activities in intrauterine tissues of the pregnant guinea pig.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 37(5), 707-715

Gniot-Szulzycka J., Drywa A. (1994):

A "soluble" form of sterol sulphate sulphohydrolase from cell nuclei of human placenta tissue-examinations with oestrone sulphate as substrate.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 49 (2-3), 195-201

Green J.M., Singer S.S. (1983):

Enzymatic sulfation of steroids. XVIII. study of the specific estradiol-17 beta sulfotransferase of rat liver cytosol, that converts the estrogen to its 3-sulfate, and some elements of the endocrine control of its production.
Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology 61, 15-22

Greiss Jr F.C., Anderson S.G. (1970):

Effect of ovarian hormones on the uterus vascular bed.
American Journal of Obstetrics and Gynecology 107, 829-836

Gronemeyer H. (1992):

Control of transcription activation by steroid hormone receptors.
FASEB Journal 6, 2524-2529

Gross T.S., Williams W.F. (1988):

In-vitro steroidsynthesis by the fetal part of the bovine placenta of cows in late gestation and at parturition: effect of a low dose of dexamethasone in vivo.
Theriogenology 32, 653-666

Grosso D.S., Way D.L. (1984):

Characterization of cytosolic estrogen sulfotransferase from RL95-2 endometrial cancer cells.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 59(5), 829-834

Grunert E., Ahlers D., Heuwieser W. (1989):

The role of endogenous estrogens in the maturation of the bovine placenta.
Theriogenology 31(5), 1081-1091

Hartung B.F. (1995):

In vitro-Nachweis des Syntheseweges von Östrogenen aus C21-Steroiden in der Rinderplazenta unter Berücksichtigung verschiedener Graviditätsstadien.
Inaugural-Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Hata H., Holinka C.F., Pahuja S.L., Hochberg R.B., Kuramoto H., Gurside E. (1987):

Estradiol metabolism in Ishikawa endometrial cancer cells.
Journal of Steroid Biochemistry 26(6), 699-704

Helmer O.M., Judson W.E. (1967):

Influence of high renin substrate levels on renin-angiotensin system in pregnancy.
American Journal of Obstetrics and Gynecology 99, 9-17

Her C., Szumlanski C., Aksoy I.A., Weinshilboum R.M. (1996):

Human jejunal estrogen sulfotransferase and dehydroepiandrosterone sulfotransferase: immunochemical characterization of individual variation.
Drug Metabolism and Disposition 24(12), 1328-1335

Hobkirk R. (1985):

Steroid sulfotransferase and steroid sulfatase characteristics and biological roles.
Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology 63, 1127-1143

Hobkirk R. (1996):

Sulfation by guinea pig chorion and uterus: differential action towards estrone and estradiol.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 59(5-6), 479-484

Hobkirk R., Cardy C., Nilsen M., Saidi F. (1982):

Estrone sulfatase activity in guinea pig tissues.
Journal of Steroid Biochemistry 17, 71-76

Hobkirk R., Cardy C.A., Saidi F., Kennedy T.G., Girard L.R. (1983):

Development and characteristics of an oestrogen sulfotransferase in placenta and uterus of the pregnant mouse.
Biochemical Journal 216, 451-457

Hobkirk R., Cardy C.A. (1985):

The in vitro formation of sulfates and glucuronides of estrogens by adult and fetal ovine tissues.
Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology 63, 785-791

Hobkirk R., Girard L.R., Durham N.J., Khalil M.W. (1985):

Behavior of mouse placental and uterine estrogen sulfotransferase during chromatography and other procedures.
Biochimica et Biophysica Acta 828, 123-129

Hobkirk R., Glasier MA, Brown LY (1990):

Purification and some characteristics of an estrogen sulfotransferase from guinea pig adrenal gland and its nonidentity with adrenal pregnenolone sulfotransferase.
Biochemical Journal 268, 759-764

Hobkirk R., Glasier M.A. (1992):

Estrogen sulfotransferase distribution in tissue of mouse and guinea pig: steroidal inhibition of the guinea pig enzyme.
Biochemistry and Cell Biology 70, 712-715

Hoedemaker M., Weston P.G., Wagner W.C. (1990):

Influence of cortisol and different steroidogenic pathways on estrogen synthesis by the bovine placenta.
American Journal of Veterinary Research 51(7), 1012-1015

Hoffmann B. (1977a):

Untersuchungen zur Steroidhormonsynthese in der Plazenta des Rindes.
Wiener Tierärztliche Monatsschrift 70, 224-228

Hoffmann B. (1977b):

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind. Entwicklung von Meßverfahren und physiologischen Daten.
Zentralblatt für Veterinärmedizin Suppl. 26, Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg, 168

Hoffmann B. (1983):

Untersuchungen zur Steroidhormonsynthese in der Placenta des Rindes.
Wiener Tierärztliche Monatsschrift 70, 224-228

Hoffmann B., Kyrein H.J., Ender M.L. (1973a):

An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma.
Hormone Research 4, 302-310

Hoffmann B., Wagner W.C., Gimenez T. (1976):

Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term.
Biology of Reproduction 15, 126-133

Hoffmann B., Wagner W.C., Rattenberger E., Schmidt J. (1977):

Endocrine relationships during late gestation and parturition in the cow.
Ciba Foundation Symposium 47, 107-125

Hoffmann B., Wagner W.C., Hixon J.E., Bahr J. (1979):

Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow.
Animal Reproduction Science 2, 253-266

Hoffmann B., Eggers G. R., Wagner W.C., Ellendorf F. (1991):

In vitro studies on the steroid synthesis by the placenta of the cow between days 200 and 255 of gestation.
Reproduction in Domestic Animals 26, 251-259

Hoffmann B., Höveler R., Hasan S.H., Failing K. (1992):

Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy.
Journal of Reproduction and Fertility 96, 837-845

Hoffmann B., Goes de Pinho T., Schuler G. (1997):

Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy.
Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes 105, 296-303

Hohls E. (1991):

Über die Beteiligung von intrazellulär gebildeten Metaboliten des Estradiols an einer nicht-genomischen Wirkung.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Chemie der Universität Hannover (angefertigt im Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie) Schriftenreihe Nr. 10, Hannover 1991

Holcenberg J.S., Rosen S.W. (1965):

Enzymatic sulfatation of steroids by bovine tissues.
Archives of Biochemistry and Biophysics 110(3), 551-557

Holinka C.F., Gurpide E. (1980):

In vivo uptake of estrone sulfate by rabbit uterus.
Endocrinology 106, 1193-1197

Holt J.A. (1989):

Regulation of progesterone production in the rabbit corpus luteum.
Biology of Reproduction 40, 201-208

Hondoh T., Yokoyama K., Suzuki T., Hirato K., Kadofuku T., Saitoh H., Yanaihara T. (1994):

Purification and properties of steroid sulfotransferase in human fetal liver.
Endocrinology Journal, 41, Suppl., 77-84

Huot R.I., Shain S.A. (1988):

Differential metabolism of dehydroepiandrosterone sulfate and estrogen conjugates by normal or malignant AXC/SSh rat prostate cells and effects of these steroid conjugates on cancer cell proliferation in vitro.
Journal of Steroid Biochemistry 29, 617-621

Huszar G., Roberts J.M. (1982):

Biochemistry and pharmacology of the myometrium and labor: Regulation at the cellular and molecular levels.

American Journal of Obstetrics and Gynecology 142(2), 225-237

Imagawa W., Tomooka Y., Hamamoto S., Nandi S. (1985):

Stimulation of mammary epithelial cell growth in vitro: interaction of epidermal growthfactor and mam-mogenic hormones.

Endocrinology 116, 1514-1524

Imagawa W., Yang J., Guzman R., Nandi S. (1994):

Control of mammary gland development.

in: Knobil E., Neill J.D. (eds) The Physiology of Reproduction. Raven Press, Ltd., New York, 1033-1063

Iwamori M., Moser H.W., Kishimoto Y. (1976a):

Solubilization and partial purification of steroid sulfatase from rat liver: characterization of estrone sulfa-tase.

Archives of Biochemistry and Biophysics 174, 199-208

Iwamori M., Moser H.W., Kishimoto Y. (1976b):

Steroid sulfatase in brain: comparison of sulfohydrolase activities for various steroid sulfates in normal and pathological brains, including the various forms of metachromatic leukodystrophy.

Journal of Neurochemistry 27, 1389-1395

Janszen B.P.M., Bevers M.M., van Tol H.T.M., Dieleman S.J., van der Weijden G.C., Taverne M.A.M. (1995):

Estrogen sulphatase activity in endometrium and foetal membranes of late gestational and parturient cows.

Animal Reproduction Science 37, 251-256

Jay B., Blach R.K., Wells R.S. (1968):

Ocular manifestations of ichthyosis.

British Journal of Ophthalmology 52, 217-226

Jensen E.V., Jacobson H.I. (1962):

Basic guides to the mechanics of estrogen action

Recent Progress in Hormone Research 18, 387-414

Jungblut P.W, Hughes A., Gaues J., Kallweit E., Maschler I., Parl F., Sierralta W.D., Szendro P.I., Wagner R.K. (1979):

Mechanisms involved in the regulation of steroid receptor levels.

Journal of Steroid Biochemistry 11, 273

Karthikeyan N., Thampan R.V. (1996):

Plasma membran is the primary site of lokalization of the nonactivated Estrogen receptor in the goat ute-rus: Hormone binding causes rezeptor internalization.

Archives of Biochemistry and Biophysics 325(1), 47-57

Kawano J., Aikawa E. (1987):

Ultrastructural localization of arylsulfatase C activity in rat kidney.

Journal of Histochemistry and Cytochemistry 35(5):523-530

Keinanen B.M., Nelson K., Daniel W.L., Roque J.M. (1983):

Genetic analysis of murine arylsulfatase C and steroid sulfatase.

Genetics 105(1):191-206

Kelly R.W., Abel M.H. (1980):

Catechol oestrogens stimulate and direct prostaglandin synthesis.

Prostaglandins 20(4), 613-626

Keyes P.L., Nalbandov A.V. (1967):

Maintenance and function of corpora lutea in rabbits depend on estrogen.
Endocrinology 80, 938-946

Keyes P.L., Kostyo J.L., Hales D.B., Chou S.Y., Constantino C.X., Payne A.H. (1990):

The biosynthesis of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 in the rabbit corpus luteum depends upon estrogen.
Endocrinology 127, 1186-1193

Khosla S.S., Rooney S.A. (1979):

Stimulation of fetal lung surfactant production by administration of 17 β -estradiol to the maternal rabbit.
American Journal of Obstetrics and Gynecology 133, 213-216

Khosla S.S., Gobran L.I., Rooney S.A. (1980):

Stimulation of phosphatidylcholin synthesis by 17 β -estradiol in fetal rabbit lung.
Biochimica et Biophysica Acta 617, 282-290

Khosla S.S., Walker Smith G.J., Parks P.A., Rooney S.A. (1981):

Effects of estrogen on fetal rabbit lung maturation: Morphological and biochemical studies.
Pediatric Research 15, 1274-1281

Kuss E. (1994):

The fetoplacental unit of primates.
Experimental and Clinical Endocrinology 102, 135-165

Lakshmi S., Balasubramanian A.S. (1979):

Studies on the chaotropically solubilized arylsulfatase C and estrone sulfatase of sheep brain.
Biochimica et Biophysica Acta 567(1):184-195

Lakshmi S., Balasubramanian A.S. (1981):

Distribution of estrone sulphatase, dehydroepiandrosterone sulphatase, and arylsulphatase C in the primate (Macaca radiata) brain and pituitary.
Journal of Neurochemistry 37, 358-362

Larson K., Wagner W.C., Sachs N. (1981):

Oestrogen synthesis by bovine foetal placenta at normal parturition.
Acta Endocrinologica 98, 112-118

Leavitt W.W., Chen T.J., Do Y.S., Carlton B.D., Allen T.C. (1978):

Biology of progesterone receptors.
in: Receptors and hormone action (Eds B.W. O'Malley and L. Birnkaumer) Vol.2, 157-188. (Academic Press: New York)

Lee Y.C., Driscoll W.J., Strott C.A. (1990):

Charge isoforms of the adrenocortical pregnenolone-binding protein: influence of phosphorylation on isoformation and binding activity.
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 87, 2003-2007

Leslie K.K., Zuckermann D.J., Schrufer J., Burchell M., Smith J., Albertson B.D. (1994):

Oestrogen modulation with parturition in the human placenta.
Placenta 15, 79-88

Lubahn D.B., Moyer J.S., Golding T.S., Couse J.F., Korach K.S., Smithies O. (1993):

Alteration of reproductive function but not prenatal development after insertional disruption of the estrogen receptor gene.
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 90, 11162-11166

Lykkesfeldt G., Hoyer H. (1983):

Topical cholesterol treatment of recessive X-linked ichthyosis.
Lancet 2 (8363), 1337-1338

Lykkesfeldt G., Hoyer H., Lykkesfeldt A.E., Skakkebaek N.E. (1983):

Steroid sulphatase deficiency associated with testis cancer.
Lancet 2 (8365-66), 1456

Lykkesfeldt G., Muller J., Skakkebaek N.E., Bruun E., Lykkesfeldt A.E. (1985):

Absence of testicular steroid sulphatase activity in a boy with recessive X-linked ichthyosis and testicular maldescent.
European Journal of Pediatrics 144, 273-274

Magness R.R., Parker Jr C.R., Rosenfeld C.R. (1993):

Systemic and uterine response to chronic infusion of estradiol-17 β .
American Journal of Physiology 265, E690-E698

Mancini M.A., Song C.S., Rao T.R., Chatterjee B., Roy A.K. (1992):

Spatiotemporal expression of estrogen sulfotransferase within the hepatic lobule of male rats: implication of in situ estrogen inactivation in androgen action.
Endocrinology 131, 1541-1546

Mason J.I., France J.T., Magness R.R., Murry B.A., Rosenfeld C.R. (1989):

Ovine placental steroid 17 β -hydroxylase / C-17,20-lase, aromatase and sulphatase in dexamethason-induced and natural parturition.
Journal of Endocrinology 122, 351-359

Matamoros R.A., Caamano L., Lamb S.V., Reimers T.J. (1994):

Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro.
Biology of Reproduction 51, 486-492

Mathew J., Balasubramanian A.S. (1982):

Arylsulfatase C and estrone sulphatase of sheep hypothalamus, preoptic area, and midbrain: separation by hydrophobic interaction chromatography and evidence for differences in their lipid environment.
Journal of Neurochemistry 39, 1205-1209

Mattioli M., Gaiani R., Bono G., Chiesa F. (1984):

Estrone to estrone sulfate conversion and viceversa in bovine placenta.
Archivio Veterinario Italiano 35, 22-26

Mehl E., Jatzkewitz H. (1968):

Cerebroside 3-sulfate as a physiological substrate of arylsulfatase A.
Biochimica et Biophysica Acta 151, 619-627

Meyers S.A., Lozon M.M., Corombos J.D., Saunders D.E., Hunter K., Christensen C., Brooks S.C. (1983):

Induction of porcine uterine estrogen sulfotransferase activity by progesterone.
Biology of Reproduction 28, 1119-1128

Milewich L., Garcia R.L., Gerrity L.W. (1984):

Steroid sulfatase and 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase activities in mouse tissues.
Journal of Steroid Biochemistry 21, 529-538

Milewich L., Porter J.C. (1987):

In situ steroid sulfatase activity in human epithelial carcinoma cells of vaginal, ovarian and endometrial origin.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 65, 164-169

- Moore SS, Thompson E.O.P., Nash A.R. (1988):**
Oestrogen sulfotransferase: isolation of a high specific activity species from bovine placenta.
Australian Journal of Biological Science 41, 333-341
- Moriyasu M, Ito A (1982):**
Transmembranous disposition of arylsulfatase C in microsomal membranes of rat liver.
Journal of Biochemistry (Tokyo) 92(4):1197-1204
- Möstl E., Möstl K., Choi H.D., Dreier H.K., Stöckl W., Bamberg E. (1981):**
Plasma levels of androstendione, epitestosterone, testosterone and oestrogens in cows at parturition.
Journal of Endocrinology 89, 251-255
- Möstl E., Kiesenhofer E., Bamberg E. (1986):**
Östrogenproduktion der Rinderplazenta in vitro.
Zuchthygiene 21, 159
- Möstl E., Scharf A., Kiesenhoffer E., Bamberg E. (1987):**
Conversion of androgens to estrogens by the bovine placenta near term.
Journal of Veterinary Medicine A 34, 515-521
- Nash A.R., Glenn W.K., Moore S.S., Kerr J., Thompson A.R., Thompson E.O.P. (1988):**
Estrogen sulfotransferase: Molecular cloning and sequencing of cDNA for the bovine placental enzyme.
Australian Journal of Biological Science 41, 507-516
- Naylor G., Poyser N.L. (1975):**
Effects of oestradiol and progesterone on the in vitro production of prostaglandin F₂ by the guinea-pig uterus.
British Journal of Pharmacology and Chemotherapy 55, 229
- Nelson K., Keinänen B.M., Daniel W.L. (1983):**
Murine arylsulfatase C: evidence for two isozymes.
Experientia 39(7):740-742
- Noel H., Plante L., Bleau G., Chapdelaine A., Roberts K.D. (1983):**
Human placental steroid sulfatase: purification and properties.
Journal of Steroid Biochemistry 19, 1591-1598
- Oeda T., Lee Y.C., Driscoll W.J., Chen H.-C., Scott C.A. (1992):**
Molecular cloning and expression of a full length cDNA encoding the guinea pig adrenocortical estrogen sulfotransferase.
Molecular Endocrinology 6, 1216-1226
- Ozawa S., Nagata K., Gong D.-W., Yamazoe Y., Kato R. (1993):**
Expression and functional characterization of a rat sulfotransferase (ST1A1) cDNA for sulfations of phenolic substrates in COS-1 cells.
Japanese Journal of Pharmacology 61, 153-156
- Pack B.A., Brooks S.C. (1970):**
Metabolism of estrogens and their sulfates in rat uterine minces.
Endocrinology (Baltimore) 87, 924-933
- Pack B.A., Booth T.E., Brooks S.C. (1979):**
The cyclic relationship of estrogen sulfurylation to the nuclear receptor level in human endometrial curettings.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 48, 420-424
- Pack B.A., Brooks S.C. (1995):**
Cyclic activity of estrogen sulfotransferase in the gilt uterus.
Endocrinology 95, 1680-1690

Pappas T.C., Gametchu B., Watson C.S. (1995):

Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding.
FASEB Journal 9(5), 404-410

Parikh I., Anderson W.L., Neame P. (1980):

Identification of high affinity estrogen binding sites in calf uterine microsomal membranes.
Journal of Steroid Biochemistry 225, 10266-10270

Park I.H., Han B.K., Jo D.H. (1997):

Distribution and characterization of neurosteroid sulfatase from the bovine brain.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 62(4), 315-320

Pasqualini J.R., Lanzone A., Tahrijoutei A., Nguyen B.L. (1982):

Effects of seven different oestrogen sulphates on uterine growth and on progesterone receptor in the foetal uterus of guinea pig after administration to the mother.
Acta Endocrinologica 101, 630-635

Payne A.H. (1980):

Testicular steroid sulfotransferases: comparison to liver and adrenal steroid sulfotransferases of the mature rat.
Endocrinology 106(5), 1365-1370

Penney L., Frederick R., Parker G. (1981):

17 β -estradiol stimulation of uterine bloodflow in oophorectomized rabbits with complete inhibition of uterine ribonucleic acid synthesis.
Endocrinology 109, 1672-1676

Pepe G.J., Albrecht E.D. (1995):

Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy.
Endocrine Reviews 16(5), 608-648

Pepe G.J., Waddell B.J., Stahl S.J., Albrecht E.D. (1988):

The regulation of transplacental cortisol-cortisone metabolism by estrogen in pregnant baboons.
Endocrinology 122, 78-83

Pewnim T., Adams J.B., Ho K.D. (1980):

A relationship between estrogen sulfurylation and estrogen and progesterone receptor status in human mammary carcinoma.
Cancer Research 40, 1360-1362

Pietras R.J., Szego C.M. (1975):

Endometrial cell calcium and oestrogen action.
Nature 253, 357-359

Pinho T.G. (1995):

Untersuchungen zum Verlauf freier und konjugierter Östrogene in Blutplasma, Kot und Urin während der Trächtigkeit des Rindes.
Inaugural-Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Pollard J.W. (1990):

Regulation of polypeptide growth factor synthesis and growth factor-related gene expression in the rat and mouse uterus before and after implantation.
Journal of Reproduction and Fertility 88, 721-731

Reddy A.G., Shivaji S., Gupta P.D. (1989):

Effect of estradiol on the membrane fluidity of the rat vaginal epithelial cells.
Journal of Steroid Biochemistry 33(6), 1229-1233

Reimers T.J., Ullmann M.B., Hansel W. (1985):

Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells.
Biology of Reproduction 33, 1227-1236

Resnik R., Killam A.P., Battaglia F.C., Makowski E.L., Meschia G. (1974):

The stimulation of uterine blood flow by various estrogens.
Endocrinology 94, 1192-1196

Resnik R., Battaglia F., Makowski E., Meschia G. (1975):

The effect of actinomycin D on estrogen induced uterine blood flow.
American Journal of Obstetrics and Gynecology 122, 273-277

Robertson H.A. (1974):

Changes in the concentration of unconjugated estrone, estradiol-17 α and estradiol-17 β in the maternal plasma of the pregnant cow in relation to the initiation of parturition and lactation.
Journal of Reproduction and Fertility 36, 1-7

Robertson H.A., King G.J. (1979):

Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy.
Journal of Reproduction and Fertility 55, 463-470

Rose F.A. (1982):

The mammalian sulphatases and placental sulphatase deficiency in man.
Journal of Inherited Metabolic Diseases 5, 145-152

Rosenfeld C.R., Morriss Jr F.H., Battaglia F.C., Makowski E.L., Meschia G. (1976):

Effect of estradiol-17 β on blood flow to reproductive and nonreproductive tissues in pregnant ewes.
American Journal of Obstetrics and Gynecology 124, 618-629

Rosenfeld C.R., Worley R.J., Milewich L., Grant N.F., Parker C.R. Jr. (1980):

Ovine fetoplacental sulfoconjugation and aromatization of dehydroepiandrosterone.
Endocrinology 106, 1971-1979

Rosenthal H.E., Ludwig G.A., Pietrzak E., Sandberg A.A. (1975):

Binding of the sulfates of estradiol-17 β to human serum albumin and plasma.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 41(6), 1144-1154

Rossier G., Pierrepont C.G. (1974):

Estrogen metabolism in sheep myometrium.
Journal of Reproduction and Fertility 37, 43-49

Roy A.B. (1976):

Sulphatases, Lysosomes and Disease.
Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 54, 111-135

Ruoff B.M., Daniel W.L. (1991):

Comparative biochemistry of mammalian arylsulfatase C and steroid sulfatase.
Comparative Biochemistry and Physiology [B] 98(2-3), 313-322

Sachs L. (1992):

In: Angewandte Statistik, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (7. Auflage), 354

Sasson S., Notides A.C. (1983):

Estrinol and estrone interaction with the estrogen receptor. II. Estrinol and estrone-induced inhibition of the cooperative binding of (³H)-estradiol to the estrogen receptor.
Journal of Biological Chemistry 258, 8118-8122

Sauerwein H., Meyer H.H.D., Möstl E. (1989):

Low sensitivity to oestrogens in bovine placenta at term.
Journal of Veterinary Medicine A 36, 236-240

Saunders D.E., Lozon M.M., Corombos J.D., Brooks S.C. (1989):

Role of porcine endometrial estrogen sulfotransferase in progesterone mediated downregulation of estrogen receptor.
Journal of Steroid Biochemistry 32(6), 749-757

Schams D., Hoffmann B., Fischer S., März E., Karg H. (1972):

Simultaneous determination of LH and progesterone in peripheral bovine blood during pregnancy, normal and corticoid-induced parturition and the post partum period.
Journal of Reproduction and Fertility 29, 37

Schmitt B. (1994):

Charakterisierung der Umsetzung von Androstendion in Östrogene durch die Plazenta beim Rind.
Inaugural-Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Schuler G., Hartung F., Hoffmann B. (1994):

Investigations on the use of C-21-Steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow.
Experimental and Clinical Endocrinology 102, 169-174

Sever R.J.P., Frost P., Weinstein G. (1968):

Eye changes in ichthyosis.
Journal of the American Medical Association 206, 2283-2286

Shankaran R., Ameen M., Daniel W.L., Davidson R.G., Chang P.L. (1991):

Characterization of arylsulfatase C isozymes from human liver and placenta.
Biochimica et Biophysica Acta

Shapiro L.J., Mohandas T., Weiss R., Romeo G. (1979):

Non-inactivation of an X-chromosome locus in man.
Science 204, 1224-1226

Simard J.P., Ameen M., Chang P.L. (1985):

Biochemical characterization of arylsulfatase-C isozymes in human fibroblasts.
Biochemical and Biophysical Research Communications 128, 1388-1394

Smith S.K., Kelly R.W. (1987):

The effect of estradiol-17 β and actinomycin D on the release of PGF and PGE of separated cells from human endometrium.
Prostaglandins 34, 553-561

Song W.-C., Moore R., McLachlan J.A., Negishi M. (1995):

Molecular characterization of a testis-specific estrogen sulfotransferase and aberrant liver expression in obese and diabetogenic C57BL / KsJ-db / db mice.
Endocrinology 136, 2477-2484

Strott C.A. (1996):

Steroid Sulfotransferases.
Endocrine Reviews 17(6), 670-698

Szego C.M. (1965):

Role of histamin in mediation of hormone action.
Federation Proceedings 24, 1343

- Szego C.M., Sjöstrand B.M., Seeler B.J., Baumer J.W., Sjöstrand F.S. (1988):**
Microtubule and plasmalemmal reorganisation: acute response to estrogen.
American Journal of Physiology 254 (Endocrinol Metab 17): E775-785
- Taverne M.A.M., Dieleman S.J., Fontijne P., van der Weijden G.C., Szenci O. (1986):**
Sudden increase of oestrone and oestradiol-17 β concentrations in amniotic fluid during the last but one week before parturition in the cow.
European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology 22, 261-262
- Taylor N.F. (1982):**
Review: placental sulphatase deficiency.
Journal of Inherited Metabolic Diseases 5, 164-176
- Tchernitchin A. (1973):**
Fine structure of rat uterine eosinophils and the possible role of eosinophiles in the mechanism of estrogen action.
Journal of Steroid Biochemistry 4, 277-282
- Tchernitchin A. (1979):**
The role of eosinophil receptors in non-genomic response to oestrogens in the uterus.
Journal of Steroid Biochemistry 11, 417-424
- Tchernitchin A., Roorijck J., Tchernitchin X., Vandenhende J., Galand P. (1974):**
Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration.
Nature 248, 142-143
- Tchernitchin A., Tchernitchin X. (1976):**
Characterization of the estrogen receptors in the uterine and blood eosinophil leukocytes.
Experientia 32, 1240
- Thorburn G.D. (1991):**
The placenta, prostaglandins and parturition: a review.
Reproduction and Fertility Development 3, 277-294
- Tomizuka T., Oeda T., Tamura Y., Yoshida S., Strott C.A. (1994):**
Characterization of guinea pig estrogen sulfotransferase expressed by chinese hamster ovary cel-K1 stable transfectants.
Endocrinology 135, 938-943
- Townsley J.D. (1973):**
Further studies on the regulation of human placental steroid 3-sulfatase activity.
Endocrinology 93, 172-181
- Tseng L., Liu H.C. (1981):**
Stimulation of arylsulfotranferase activity by progestins in human endometrium in vitro.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 53, 418-421
- Tseng L., Lee L.Y., Mazella J. (1985):**
Estrogen sulfotransferase in human placenta.
Journal of Steroid Biochemistry 22(5), 611-615
- Vaccaro A.M., Salvioli R., Muscillo M., Renola L. (1987):**
Purification and properties of arylsulfatase C from human placenta.
Enzyme 37(3):115-126

Vielemeier A. (2000):

Etablierung eines in vitro-Testsystemes zur Bestimmung der Aktivitäten von Steroidsulfatase und Östrogensulfotransferase in der Plazenta des Rindes.

Inaugural-Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (in Vorbereitung)

Wathes D.C., Porter D.G. (1982):

Effect of uterine distension and estrogen treatment on gap junction formation in the myometrium of the rat.

Journal of Reproduction and Fertility 65, 497-505

Wehling M. (1997):

Specific, nongenomic actions of steroid hormones.

Annual Review of Physiology 59, 365-393

Weiss D.J., Gurpide E. (1988):

Non-genomic effects of estrogens and antiestrogens.

Journal of Steroid Biochemistry 31, 671

Wengle B. (1966):

Distribution of some steroid sulphokinase in foetal human tissues.

Acta Endocrinologica (Copenhagen) 52, 607-618

Whitnall M.H., Driscoll W.J., Lee Y.C., Strott C.A. (1993):

Estrogen and hydroxysteroid sulfotransferases in guinea pig adrenal cortex: cellular and subcellular distributions.

Endocrinology 133(5), 2284-2291

Willemsen R., Kroos M., Hoogeven A.T., Van Dongen J.M., Parenti G., Van der Loos C.M., Reuser A.J.J. (1988):

Ultrastructural localisation of steroid sulphatase in cultured human fibroblasts by immunocytochemistry: a comparative study with lysosomal enzymes and the mannose 6-phosphate receptor.

Histochemical Journal 20, 41-51

Yamamoto T. (1995):

Effects of estrogens on Ca channels in myometrial cells isolated from pregnant rats.

American Journal of Physiology 268, C64-C69

Yoshiike T., Matsui T., Ogawa H. (1985):

The effect of steroid sulphatase on stratum corneum shedding in patients with X-linked ichthyosis.

British Journal of Dermatology 112, 431-433

9 Tabellenanhang

9.1 Proteingehalt in den subzellulären Fraktionen bei der Inkubation

Tabelle 18: Zum Rücklösen der Pellets bzw. zum Verdünnen der Zytosole eingesetzte Puffermengen (ml) der subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe (Kernfraktion = S1, Mitochondrienfraktion = S2, Mikrosomenfraktion = S3).

Tag der Gravidität	220	220	220	240	270	270	240	240	150	150	150
Kuh Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1 fetal	26	26	20	10	10	10	10	10	10	10	10
S2 fetal	17,7	26	10	10	10	10	10	10	10	10	10
S3 fetal	15,5	20,8	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cytosol fetal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1 maternal	26	26	20	10	10	10	10	10	10	10	10
S2 maternal	26	26	10	10	10	10	10	10	10	10	10
S3 maternal	20,8	20,8	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cytosol maternal	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 19: Proteingehalte ($\mu\text{g} / \text{ml}$) der unveränderten subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe (Kernfraktion = S1, Mitochondrienfraktion = S2, Mikrosomenfraktion = S3).

Tag der Gravidität	220	220	220	240	270	270	240	240	150	150	150
Kuh Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1 fetal	1078	10780	4130	9350	2850	8200	10560	5500	4400	9900	11710
S2 fetal	4070	2310	4900	8200	5900	7900	7590	5005	3575	3800	2600
S3 fetal	2090	1595	3920	2850	1300	2750	2475	1320	1650	4600	3400
Cytosol fetal	1485	1518	2240	2800	1000	1700	1705	1320	1100	2300	1600
S1 maternal	3487	5170	6300	14600	11150	10200	10340	11770	10230	13700	9900
S2 maternal	3278	3432	7910	12400	8600	7200	9570	6270	5280	7350	8500
S3 maternal	1980	3410	5600	6400	5750	5200	10010	4345	5720	7200	6000
Cytosol maternal	1980	3245	4480	4600	3300	3400	2695	3300	2420	3000	3000

Tabelle 20: Proteingehalte ($\mu\text{g} / \text{ml}$) der in die Inkubationsansätze eingebrachten subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe zur Bestimmung der Östrogensulfotransferaseaktivität (Kernfraktion = S1, Mitochondrienfraktion = S2, Mikrosomenfraktion = S3).

Tag der Gravidität	220	220	220	240	270	270	240	240	150	150	150
Kuh Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1 fetal	1078	10780	4130	4137	2850	4100	10560	5500	4400	9900	10743
S2 fetal	4070	2310	4900	2309	5900	2310	2300	2306	2306	2303	2301
S3 fetal	2090	1595	3920	1592	1300	1599	1597	1320	1602	1597	1596
Cytosol fetal	1485	1518	2240	1521	1000	1518	1705	1320	1100	1513	1524
S1 maternal	3487	5170	6300	5177	5068	5178	5170	5162	5167	5170	5183
S2 maternal	3278	3432	7910	3434	3440	3429	3418	3426	3429	3435	3427
S3 maternal	1980	3410	5600	3404	3382	3421	3452	3421	3405	3412	3409
Cytosol maternal	1980	3245	4480	3239	3300	3400	2695	3300	2420	3000	3000

Tabelle 21: Proteingehalte ($\mu\text{g} / \text{ml}$) der in die Inkubationsansätze eingebrachten subzellulären Fraktionen aus Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe zur Bestimmung der Steroidsulfataseaktivität (Kernfraktion = S1, Mitochondrienfraktion = S2, Mikrosomenfraktion = S3).

Tag der Gravidität	220	220	220	240	270	270	240	240	150	150	150
Kuh Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1 fetal	1078	10780	4130	1034	285	410	1056	550	440	990	1074
S2 fetal	4070	2310	4900	577	590	231	230	231	231	230	230
S3 fetal	2090	1595	3920	398	130	160	160	132	160	160	160
Cytosol fetal	1485	1518	2240	340	100	152	171	132	110	151	152
S1 maternal	3487	5170	6300	1294	507	518	517	516	517	517	518
S2 maternal	3278	3432	7910	859	344	343	342	343	343	343	343
S3 maternal	1980	3410	5600	851	338	342	345	342	340	341	341
Cytosol maternal	1980	3245	4480	810	330	340	270	330	242	300	300

9.2 Ergebnisse aus den Untersuchungen auf das Vorkommen von Östrogensulfotransferase durch Darstellung der Sulfokonjugation von ^3H -Estron zu ^3H -Estronsulfat

9.2.1 Inkubationen mit Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe

Tabelle 22: Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch Homogenate aus Kotyledonengewebe zu verschiedenen Trächtigkeitszeitpunkten sowie unter der Geburt (Tag 240 und 270: n = 3 Tiere; Tag 150, 220 und Geburt: n = 4 Tiere). Angegeben ist die Sulfatierung des ^3H -markierten Estrons in % bezogen auf die eingesetzte Substratmenge. Angaben der arcsin-transformierten Meßwerte als Median (M) und einfacher Streubereich (Obergrenze = OG; Untergrenze = UG) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		Tag der Gravidität				
		150	220	240	270	Geburt
MLW	M	3	2	2,7	1,9	2,5
	OG	3,6	2,4	3,8	2,2	4,3
	UG	2,5	1,7	1,8	1,6	1,2
GLW	M	2,3	2,3	2,7	3,4	6,8
	OG	2,4	2,7	3,6	5,8	14,6
	UG	2,2	1,9	1,9	1,6	1,8
0 min	M	4,1	4,5	4,8	5,5	4,3
	OG	6,3	5,5	7	11,9	9,3
	UG	2,4	3,6	3	1,5	1,2
5 min	M	48,7	51,4	54,4	46,6	22,6
	OG	60,7	61,3	62,9	49,2	43
	UG	36,8	41,5	45,7	44	7,4
15 min	M	62,7	62,5	63,1	68	38,3
	OG	73,8	67,8	72,7	77,6	70,8
	UG	50,8	57,1	52,9	57,6	10,8
30 min	M	65,9	65,4	65,2	73	42,5
	OG	74,3	70,1	74,2	87,4	74,3
	UG	56,9	60,6	55,6	55,5	13,8
AUC	M	55,0	55,6	56,5	58,5	32,4
	OG	60,0	58,3	61,4	63,2	45,5
	UG	50,0	52,8	51,6	53,6	20,5

Tabelle 23: Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch Homogenate aus Karunkelgewebe zu verschiedenen Trächtigkeitszeitpunkten sowie unter der Geburt (Tag 240 und 270: n = 3 Tiere; Tag 150, 220 und Geburt: n = 4 Tiere). Angegeben ist die Sulfatierung des ^3H -markierten Estrons in % bezogen auf die eingesetzte Substratmenge. Angaben der arcsin-transformierten Meßwerte als Median (M) und einfacher Streubereich (Obergrenze = OG; Untergrenze = UG) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		Tag der Gravidität				
		150	220	240	270	Geburt
MLW	M	3	2	2,7	1,9	2,5
	OG	3,6	2,4	3,8	2,2	4,3
	UG	2,5	1,7	1,8	1,6	1,2
GLW	M	2,7	2,2	3	5,3	8
	OG	3,1	2,6	4,4	7,7	15,2
	UG	2,4	1,9	1,9	3,3	3
0 min	M	5,5	5,5	5,5	7,6	5,3
	OG	9,9	8,1	7,5	13,3	13,4
	UG	2,3	3,4	3,8	3,4	0,8
5 min	M	31	43	34,4	39,9	29,1
	OG	53,5	60,1	62,4	41,4	51,3
	UG	12,5	26,7	11,3	38,5	11,2
15 min	M	31,4	45,5	39,9	46,9	37,3
	OG	51,3	62,7	65,2	57,8	58,3
	UG	14,5	28,9	17,1	36,1	18,6
30 min	M	34,6	46,9	38,3	51,3	38,9
	OG	54,1	65,9	67,2	69,7	58,2
	UG	17,5	28,4	13,3	32,8	21,3
AUC	M	29,9	41,8	35,1	42,9	33,1
	OG	39,2	50,1	49,5	48,3	42,4
	UG	21,3	33,7	21,9	37,5	24,4

Tabelle 24: Statistische Auswertung (zweifaktorielle Varianzanalyse) der Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebeshomogenate. Es wurden der Einfluß der Trächtigkeitsdauer (T-Dauer) und der Gewebeherkunft (Herkunft) sowie die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren (p(HT)) untersucht. Neben den Umwandlungsraten zu den einzelnen Inkubationszeiten wurde auch die AUC ausgewertet.

	Inkubationszeit	p (T-Dauer)	p (Herkunft)	p (HT)
mit Geburtstieren (n = 18)	0 min	n.s.	0,02	n.s.
	5 min	n.s.	<0,01	n.s.
	15 min	n.s.	<0,001	n.s.
	30 min	n.s.	<0,001	n.s.
	AUC	n.s.	<0,001	n.s.

Tabelle 25: Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch Kotyledonen- und Karunkelgewebeshomogenate. Angegeben ist die Sulfokonjugation des ^3H -markierten Estrons in % bezogen auf die eingesetzte Substratmenge (n = 18). Angaben der arcsin-transformierten Meßwerte als Median und einfacher Streubereich (Obergrenze = OG; Untergrenze = UG) nach Rücktransformation.

Herkunft des Gewebes	Inkubations-ansatz	Median	Streubereich	
			OG	UG
Kotyledonen-gewebehomogenat	MLW	2,4	3,5	1,5
	GLW	3,4	7	1,1
	0 min	4,6	7,7	2,3
	5 min	43,8	61	27,3
	15 min	58,3	76,4	38,9
	30 min	61,8	79,5	42,3
	AUC	50,9	54,9	46,9
Karunkelgewebe-homogenat	MLW	2,4	3,5	1,5
	GLW	3,7	7,9	1
	0 min	5,8	10,2	2,6
	5 min	35,2	54,1	18,4
	15 min	39,8	58	23
	30 min	41,6	61,1	23,4
	AUC	36,2	40,2	32,3

9.2.2 Inkubationen mit subzellulären Fraktionen

Tabelle 26: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe von 150 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	1,41	1,41	1,41	1,41
GLW	\bar{x}_g	0,002	0,005	0,006	0,008
	SF	1,45	1,10	1,12	1,09
0 min	\bar{x}_g	0,005	0,005	0,006	0,020
	SF	2,31	1,00	1,09	1,41
5 min	\bar{x}_g	0,019	0,012	0,015	0,305
	SF	1,53	1,05	1,46	1,22
15 min	\bar{x}_g	0,021	0,023	0,026	0,318
	SF	1,18	1,05	1,50	1,21
30 min	\bar{x}_g	0,022	0,026	0,030	0,328
	SF	1,28	1,14	1,51	1,21
AUC	\bar{x}_g	0,580	0,580	0,684	8,767
	SF	1,30	1,05	1,48	1,22

Tabelle 27: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe von 220 Tagen tragenden Kühen ($n = 4$). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	5,53	5,53	5,53	5,53
GLW	\bar{x}_g	0,003	0,006	0,005	0,014
	SF	2,98	3,41	1,12	4,32
0 min	\bar{x}_g	0,003	0,003	0,005	0,017
	SF	4,73	1,49	1,12	1,45
5 min	\bar{x}_g	0,015	0,011	0,013	0,292
	SF	4,80	1,67	1,36	1,47
15 min	\bar{x}_g	0,033	0,021	0,028	0,298
	SF	4,66	2,10	1,62	1,48
30 min	\bar{x}_g	0,044	0,026	0,037	0,315
	SF	4,53	2,72	1,84	1,48
AUC	\bar{x}_g	0,857	0,556	0,737	8,325
	SF	4,63	2,17	1,63	1,47

Tabelle 28: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe von 240 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	1,42	1,42	1,42	1,42
GLW	\bar{x}_g	0,002	0,005	0,007	0,008
	SF	1,48	1,15	1,28	1,19
0 min	\bar{x}_g	0,002	0,005	0,007	0,021
	SF	1,89	1,26	1,30	1,54
5 min	\bar{x}_g	0,021	0,018	0,041	0,157
	SF	1,44	1,21	1,48	1,86
15 min	\bar{x}_g	0,034	0,036	0,084	0,262
	SF	1,66	1,18	1,23	1,11
30 min	\bar{x}_g	0,037	0,045	0,100	0,271
	SF	1,68	1,30	1,07	1,19
AUC	\bar{x}_g	0,861	0,937	2,147	6,703
	SF	1,62	1,18	1,16	1,06

Tabelle 29: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe von 270 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	1,44	1,44	1,44	1,44
GLW	\bar{x}_g	0,003	0,011	0,017	0,033
	SF	1,18	7,00	4,29	6,50
0 min	\bar{x}_g	0,003	0,005	0,010	0,043
	SF	1,00	4,48	1,93	2,80
5 min	\bar{x}_g	0,020	0,009	0,020	0,347
	SF	1,04	2,00	1,03	1,42
15 min	\bar{x}_g	0,037	0,011	0,027	0,368
	SF	1,08	1,78	1,60	1,46
30 min	\bar{x}_g	0,047	0,012	0,030	0,375
	SF	1,00	1,70	2,08	1,45
AUC	\bar{x}_g	0,976	0,320	0,771	10,139
	SF	1,03	1,82	1,46	1,46

Tabelle 30: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe von 150 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	1,41	1,41	1,41	1,41
GLW	\bar{x}_g	0,003	0,003	0,003	0,005
	SF	1,03	1,14	1,08	1,09
0 min	\bar{x}_g	0,002	0,003	0,003	0,011
	SF	1,26	1,18	1,00	1,49
5 min	\bar{x}_g	0,005	0,004	0,004	0,109
	SF	1,92	1,00	1,18	1,11
15 min	\bar{x}_g	0,007	0,005	0,004	0,122
	SF	1,81	1,11	1,29	1,04
30 min	\bar{x}_g	0,009	0,006	0,004	0,126
	SF	1,68	1,11	1,14	1,13
AUC	\bar{x}_g	0,205	0,147	0,117	3,315
	SF	1,76	1,08	1,17	1,08

Tabelle 31: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe von 220 Tagen tragenden Kühen ($n = 4$). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	5,53	5,53	5,53	5,53
GLW	\bar{x}_g	0,002	0,007	0,007	0,011
	SF	1,13	5,53	3,56	6,64
0 min	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,003	0,014
	SF	1,00	1,22	1,33	3,02
5 min	\bar{x}_g	0,007	0,008	0,009	0,172
	SF	1,60	2,47	1,90	2,12
15 min	\bar{x}_g	0,010	0,013	0,014	0,184
	SF	1,86	3,46	2,33	2,11
30 min	\bar{x}_g	0,011	0,013	0,013	0,187
	SF	1,99	3,67	2,30	2,08
AUC	\bar{x}_g	0,268	0,334	0,350	5,034
	SF	1,81	3,23	2,16	2,11

Tabelle 32: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe von 240 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	1,42	1,42	1,42	1,42
GLW	\bar{x}_g	0,003	0,003	0,003	0,005
	SF	1,11	1,10	1,08	1,16
0 min	\bar{x}_g	0,002	0,003	0,003	0,018
	SF	1,26	1,18	1,00	1,74
5 min	\bar{x}_g	0,010	0,007	0,007	0,115
	SF	2,72	1,59	1,40	1,22
15 min	\bar{x}_g	0,016	0,010	0,011	0,123
	SF	2,81	2,00	2,02	1,20
30 min	\bar{x}_g	0,017	0,011	0,013	0,128
	SF	2,90	2,38	2,39	1,23
AUC	\bar{x}_g	0,401	0,270	0,311	3,413
	SF	2,76	1,99	1,96	1,22

Tabelle 33: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe von 270 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	1,44	1,44	1,44	1,44
GLW	\bar{x}_g	0,002	0,008	0,010	0,021
	SF	1,00	4,90	6,03	9,76
0 min	\bar{x}_g	0,002	0,004	0,004	0,034
	SF	1,00	1,76	1,49	4,46
5 min	\bar{x}_g	0,006	0,005	0,006	0,168
	SF	1,77	1,11	1,18	2,62
15 min	\bar{x}_g	0,008	0,005	0,006	0,173
	SF	1,44	1,11	1,44	2,79
30 min	\bar{x}_g	0,008	0,005	0,006	0,176
	SF	1,29	1,11	1,34	2,81
AUC	\bar{x}_g	0,210	0,158	0,174	4,839
	SF	1,44	1,11	1,27	2,76

Tabelle 34: Dreifaktorielle Varianzanalyse der Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe. Es wurden der Einfluß der Trächtigkeitsdauer (T-Dauer), der subzellulären Fraktionen (Aufbereitung) und der Gewebeherkunft (Herkunft) auf die Sulfokonjugation von ^3H -Estron, sowie die Wechselwirkungen zwischen den drei Einflußfaktoren untersucht. P(AT) steht für die Wechselwirkung zwischen der Aufbereitung und der T-Dauer, p(HT) für die Wechselwirkung zwischen der Herkunft und der T-Dauer und p(AHT) für die Wechselwirkung zwischen allen drei Faktoren.

Inkubationszeit	p (T-Dauer)	p (Aufbe- reitung)	p (AT)	p (Her- kunft)	p (HT)	p (AH)	p (AHT)
0 min	n.s.	<0,001	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.
5 min	n.s.	<0,001	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.
15 min	n.s.	<0,001	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.
30 min	n.s.	<0,001	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.
AUC	n.s.	<0,001	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 35: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe unabhängig vom Graviditätsstadium (n = 14). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	2,31	2,31	2,31	2,31
GLW	\bar{x}_g	0,002	0,006	0,008	0,013
	SF	1,85	3,34	2,48	3,80
0 min	\bar{x}_g	0,003	0,004	0,007	0,023
	SF	2,25	1,97	1,52	1,88
5 min	\bar{x}_g	0,019	0,012	0,019	0,266
	SF	1,82	1,61	1,70	1,60
15 min	\bar{x}_g	0,029	0,021	0,035	0,308
	SF	1,86	1,82	1,85	1,34
30 min	\bar{x}_g	0,034	0,025	0,042	0,320
	SF	1,93	2,06	1,97	1,34
AUC	\bar{x}_g	0,784	0,557	0,937	8,387
	SF	1,21	1,18	1,17	1,09

Tabelle 36: Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe ($n = 14$). Angegeben ist Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Sulfatierung von ^3H -Estron wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,002	0,002	0,002	0,002
	SF	2,31	2,31	2,31	2,31
GLW	\bar{x}_g	0,002	0,005	0,005	0,009
	SF	1,18	3,44	3,42	5,06
0 min	\bar{x}_g	0,002	0,003	0,003	0,017
	SF	1,18	1,44	1,27	2,62
5 min	\bar{x}_g	0,007	0,006	0,006	0,140
	SF	1,90	1,77	1,67	1,81
15 min	\bar{x}_g	0,010	0,008	0,008	0,150
	SF	1,99	2,23	2,12	1,82
30 min	\bar{x}_g	0,011	0,008	0,008	0,154
	SF	1,98	2,34	2,17	1,82
AUC	\bar{x}_g	0,266	0,221	0,225	4,141
	SF	1,22	1,23	1,21	1,18

Tabelle 37: Statistische Auswertung (zweifaktorielle Varianzanalyse) der Ergebnisse der Sulfokonjugation von ^3H -Estron durch Cytosol aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe. Es wurden der Einfluß der Trächtigkeitsdauer (T-Dauer), der Gewebeherkunft (Herkunft) sowie die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren (p(HT)) untersucht. Neben den Umwandlungsraten zu den einzelnen Inkubationszeiten wurde auch die AUC ausgewertet.

Inkubationszeit (min)	p (T-Dauer)	p (Herkunft)	p (HT)
0	n.s.	n.s.	n.s.
5	n.s.	<0.001	n.s.
15	n.s.	<0.001	n.s.
30	n.s.	<0.001	n.s.
AUC	n.s.	<0.001	n.s.

9.3 Ergebnisse aus den Untersuchungen auf das Vorkommen von Steroidsulfatase durch Erfassung der Umwandlung von ^3H -Estronsulfat zu ^3H -Estron

9.3.1 Inkubationen mit Homogenaten aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe

Tabelle 38: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch Homogenate aus Kotyledonengewebe zu verschiedenen Trächtigkeitszeitpunkten sowie unter der Geburt (Tag 240 und 270: n = 3 Tiere bzw Tag 150, 220 und Geburt: n = 4 Tiere pro Gruppe). Angegeben ist die Hydrolyse des ^3H -markierten Estronsulfates in % bezogen auf die eingesetzte Substratmenge. Angaben der arcsin-transformierten Meßwerte als Median (M) und einfacher Streubereich (Obergrenze = OG; Untergrenze = UG) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		Tag der Gravidität				
		150	220	240	270	Geburt
MLW	M	2,9	1,5	2,4	1,6	4,5
	OG	3,8	1,8	3,2	1,9	6,8
	UG	2,1	1,2	1,7	1,4	2,7
GLW	M	13	11,3	11,6	10,9	12,2
	OG	17	20,3	14,7	14,9	14,6
	UG	9,5	4,7	8,9	7,5	10
0 min	M	15,9	19,4	21,9	14,8	10,9
	OG	20,8	23,1	31,2	17,7	18,6
	UG	11,5	16	13,9	12,1	5,1
5 min	M	32	31,6	32,9	31,7	14,5
	OG	42,3	40	47,6	37,5	21,6
	UG	22,6	23,8	19,8	26,2	8,6
15 min	M	52,1	43,5	52	56,2	21,9
	OG	69,7	46,3	72,7	70,7	32,8
	UG	34,2	40,7	30,9	41,2	12,7
30 min	M	65,9	58,1	65,9	75,3	30,6
	OG	82,7	67,9	84,7	84,5	46,5
	UG	46,8	48	44,1	64,8	16,7
AUC	M	47,2	41,1	48,0	51,2	21,3
	OG	54,7	43,8	58,7	56,9	26,6
	UG	39,9	38,3	37,4	45,6	16,4

Tabelle 39: Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch Homogenate aus Karunkelgewebe zu verschiedenen Trächtigkeitszeitpunkten sowie unter der Geburt (Tag 240 und 270: n = 3 Tiere bzw Tag 150, 220 und Geburt: n = 4 Tiere pro Gruppe). Angegeben ist die Hydrolyse des ^3H -markierten Estronsulfates in % bezogen auf die eingesetzte Substratmenge. Angaben der arcsin-transformierten Meßwerte als Median (M) und einfacher Streubereich (Obergrenze = OG; Untergrenze = UG) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		Tag der Gravidität				
		150	220	240	270	Geburt
MLW	M	2,9	1,5	2,4	1,6	4,5
	OG	3,8	1,8	3,2	1,9	6,8
	UG	2,1	1,2	1,7	1,4	2,7
GLW	M	18,3	15,9	11,1	12,8	12,7
	OG	22,8	20,7	18	16,7	18,2
	UG	14,2	11,6	5,7	9,4	8,1
0 min	M	44,1	36	64,5	27,9	17,8
	OG	57,5	48,2	94,6	42,4	33,8
	UG	31,1	24,6	25,4	15,4	6,2
5 min	M	81,2	73,6	73,1	64,6	25,6
	OG	89,5	84,9	96,8	79,8	48,9
	UG	71,1	60,5	37,6	47,7	8
15 min	M	86	84,7	79,9	86	38,6
	OG	91,7	90,5	96,9	92,3	71,4
	UG	79,1	77,8	53,3	78,1	10,8
30 min	M	88,3	85,4	86,1	91,7	48,1
	OG	93,2	92,5	95,9	92,9	84,5
	UG	82,3	76,4	71,7	90,4	12,8
AUC	M	81,8	76,0	78,7	77,3	35,7
	OG	85,2	79,7	90,5	81,5	51,2
	UG	78,2	72,2	63,8	72,7	21,5

Tabelle 40: Statistische Auswertung (zweifaktorielle Varianzanalyse) der Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebekomogenate. Es wurden der Einfluß der Trächtigkeitsdauer (T-Dauer), der Gewebeherkunft (Herkunft) sowie die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren (p(HT)) untersucht. Neben den Umwandlungsraten zu den einzelnen Inkubationszeiten wurde auch die AUC ausgewertet.

	Inkubationszeit	p (T-Dauer)	p (Herkunft)	p (HT)
mit Geburtstieren (n = 18)	0 min	n.s.	<0,001	n.s.
	5 min	0,02	<0,001	0,03
	15 min	0,02	<0,001	n.s.
	30 min	0,03	<0,001	n.s.
	AUC	0,03	<0,001	n.s.
ohne Geburtstiere (n = 14)	0 min	n.s.	<0,001	n.s.
	5 min	n.s.	<0,001	n.s.
	15 min	n.s.	<0,001	n.s.
	30 min	n.s.	<0,001	n.s.
	AUC	n.s.	<0,001	n.s.

Tabelle 41: Hydrolyse von Estronsulfat durch Kotyledonen- und Karunkelgewebekomogenate. Angegeben ist die Hydrolyse des ^3H -markierten Estronsulfates in % bezogen auf die eingesetzte Substratmenge (n = 18). Angaben der arcsin-transformierten Meßwerte als Median und einfacher Streubereich (Obergrenze = OG; Untergrenze = UG) nach Rücktransformation.

Herkunft des Gewebes	Inkubations-ansatz	Median	Streubereich	
			OG	UG
Kotyledonen-gewebekomogenat	MLW	2,3	4,4	0,9
	GLW	9,4	18,2	3,3
	0 min	16,2	23,1	10,3
	5 min	27,7	39,7	17,2
	15 min	43,8	63	25,5
	30 min	58,1	78,7	36
	AUC	40,5	44,5	36,5
Karunkelgewebe-homogenat	MLW	2,9	3,8	2,1
	GLW	18,3	22,9	14,1
	0 min	36,6	61,2	15,3
	5 min	63,6	87,9	34,7
	15 min	75,1	94,6	47,5
	30 min	80,3	96,7	54,8
	AUC	69,5	75,3	63,4

9.3.2 Inkubationen mit subzellulären Fraktionen

Tabelle 42: Statistische Auswertung (zweifaktorielle Varianzanalyse) der Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe. Es wurden der Einfluß der Trächtigkeitsdauer (T-Dauer), der Gewebeherkunft (Herkunft) sowie die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren (p(HT)) untersucht. Neben den Umwandlungsraten zu den einzelnen Inkubationszeiten wurde auch die AUC berechnet. Kernfraktion = S1, Mitochondrienfraktion = S2, Mikrosomenfraktion = S3, Cytosol = Cyt.

subzelluläre Fraktion	Inkubationszeit (min)	p (T-Dauer)	p (Herkunft)	p (HT)
Kernfraktion	0	n.s.	<0,01	n.s.
	5	n.s.	<0,01	n.s.
	15	n.s.	0.02	n.s.
	30	n.s.	n.s.	n.s.
	AUC	n.s.	0.015	n.s.
Mitochondrienfraktion	0	n.s.	<0,01	n.s.
	5	n.s.	<0,01	n.s.
	15	n.s.	0.01	n.s.
	30	n.s.	n.s.	n.s.
	AUC	n.s.	<0,01	n.s.
Mikrosomenfraktion	0	n.s.	n.s.	n.s.
	5	n.s.	<0.001	0.031
	15	n.s.	0.02	n.s.
	30	n.s.	n.s.	n.s.
	AUC	n.s.	0.01	n.s.
Cytosol	0	n.s.	<0,01	n.s.
	5	n.s.	<0,01	n.s.
	15	n.s.	<0.001	n.s.
	30	0.039	<0,01	n.s.
	AUC	n.s.	<0.001	n.s.

Tabelle 43: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe unabhängig vom Graviditätsstadium ($n = 14$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,015	0,015	0,015	0,015
	SF	3,19	3,19	3,19	3,19
GLW	\bar{x}_g	0,037	0,111	0,142	0,071
	SF	2,11	1,87	1,80	3,67
0 min	\bar{x}_g	0,063	0,142	0,166	0,049
	SF	2,80	2,08	2,23	2,43
5 min	\bar{x}_g	0,099	0,253	0,285	0,131
	SF	2,66	2,33	2,39	2,06
15 min	\bar{x}_g	0,174	0,411	0,501	0,278
	SF	2,88	2,66	2,58	2,13
30 min	\bar{x}_g	0,277	0,594	0,719	0,425
	SF	2,97	2,92	2,82	2,25
AUC	\bar{x}_g	5,207	12,014	14,362	7,802
	SF	1,39	1,32	1,32	1,24

Tabelle 44: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe ($n = 14$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,015	0,015	0,015	0,015
	SF	3,19	3,19	3,19	3,19
GLW	\bar{x}_g	0,037	0,099	0,092	0,035
	SF	1,75	1,86	1,99	4,05
0	\bar{x}_g	0,168	0,247	0,219	0,029
	SF	3,36	3,12	3,28	2,48
5	\bar{x}_g	0,307	0,469	0,451	0,072
	SF	3,07	3,31	3,22	2,25
15	\bar{x}_g	0,415	0,586	0,630	0,132
	SF	2,74	3,13	3,03	2,40
30	\bar{x}_g	0,508	0,618	0,698	0,202
	SF	2,68	3,27	2,90	2,53
AUC	\bar{x}_g	11,926	16,376	17,286	3,834
	SF	1,36	1,37	1,35	1,27

Tabelle 45: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe von 150 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,032	0,032	0,032	0,032
	SF	2,25	2,25	2,25	2,25
GLW	\bar{x}_g	0,056	0,202	0,187	0,126
	SF	1,81	1,12	1,21	1,37
0	\bar{x}_g	0,137	0,284	0,245	0,108
	SF	2,61	1,60	1,17	1,35
5	\bar{x}_g	0,148	0,441	0,368	0,202
	SF	2,77	1,80	1,42	1,42
15	\bar{x}_g	0,224	0,828	0,755	0,376
	SF	3,47	1,91	1,53	1,69
30	\bar{x}_g	0,361	1,360	0,294	0,605
	SF	3,04	1,65	1,29	1,55
AUC	\bar{x}_g	7,004	24,655	22,589	11,087
	SF	3,12	1,77	1,39	1,57

Tabelle 46: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe von 220 Tagen tragenden Kühen ($n = 4$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,004	0,004	0,004	0,004
	SF	4,61	4,61	4,61	4,61
GLW	\bar{x}_g	0,016	0,064	0,078	0,032
	SF	1,97	1,28	1,13	6,45
0	\bar{x}_g	0,025	0,081	0,090	0,020
	SF	4,22	1,29	1,13	2,36
5	\bar{x}_g	0,056	0,150	0,166	0,068
	SF	4,23	1,41	1,32	1,77
15	\bar{x}_g	0,110	0,221	0,285	0,135
	SF	5,06	1,83	1,28	1,86
30	\bar{x}_g	0,137	0,258	0,349	0,185
	SF	5,32	2,10	1,45	1,96
AUC	\bar{x}_g	2,887	6,104	7,744	3,650
	SF	5,00	1,77	1,26	1,88

Tabelle 47: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe von 240 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,012	0,012	0,012	0,012
	SF	1,62	1,62	1,62	1,62
GLW	\bar{x}_g	0,031	0,100	0,142	0,065
	SF	1,59	2,20	2,54	2,00
0	\bar{x}_g	0,048	0,141	0,208	0,064
	SF	2,59	2,98	4,43	2,29
5	\bar{x}_g	0,082	0,258	0,349	0,164
	SF	3,34	4,43	5,82	2,56
15	\bar{x}_g	0,140	0,424	0,556	0,427
	SF	3,47	4,89	6,20	2,21
30	\bar{x}_g	0,225	0,692	0,823	0,666
	SF	3,59	4,87	6,24	2,14
AUC	\bar{x}_g	4,192	12,841	16,323	11,735
	SF	3,45	4,73	6,06	2,21

Tabelle 48: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonengewebe von 270 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,024	0,024	0,024	0,024
	SF	1,15	1,15	1,15	1,15
GLW	\bar{x}_g	0,061	0,166	0,162	0,122
	SF	1,51	1,53	1,15	2,21
0	\bar{x}_g	0,073	0,124	0,167	0,057
	SF	1,17	1,65	1,87	1,63
5	\bar{x}_g	0,130	0,239	0,311	0,165
	SF	1,43	1,87	1,68	1,76
15	\bar{x}_g	0,260	0,369	0,527	0,348
	SF	1,54	2,19	2,20	1,91
30	\bar{x}_g	0,516	0,512	0,718	0,573
	SF	1,11	2,51	2,76	2,01
AUC	\bar{x}_g	8,336	10,780	14,897	10,051
	SF	1,29	2,13	2,25	1,92

Tabelle 49: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe von 150 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,032	0,032	0,032	0,032
	SF	2,25	2,25	2,25	2,25
GLW	\bar{x}_g	0,066	0,154	0,163	0,065
	SF	1,27	1,25	1,12	1,26
0	\bar{x}_g	0,280	0,500	0,676	0,070
	SF	2,76	2,29	1,89	1,41
5	\bar{x}_g	0,435	1,065	1,213	0,116
	SF	2,09	1,85	1,53	1,60
15	\bar{x}_g	0,638	1,419	0,711	0,219
	SF	1,65	1,45	1,09	1,72
30	\bar{x}_g	0,981	1,647	1,841	0,311
	SF	1,11	1,19	1,01	1,92
AUC	\bar{x}_g	19,802	39,838	46,441	6,148
	SF	1,51	1,44	1,16	1,75

Tabelle 50: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe von 220 Tagen tragenden Kühen ($n = 4$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,004	0,004	0,004	0,004
	SF	4,61	4,61	4,61	4,61
GLW	\bar{x}_g	0,021	0,072	0,073	0,019
	SF	1,26	1,73	2,00	7,75
0	\bar{x}_g	0,066	0,103	0,098	0,014
	SF	2,19	1,66	1,92	2,84
5	\bar{x}_g	0,130	0,189	0,182	0,037
	SF	1,66	1,91	1,40	2,40
15	\bar{x}_g	0,169	0,221	0,252	0,053
	SF	1,74	1,81	1,56	1,93
30	\bar{x}_g	0,176	0,197	0,276	0,075
	SF	1,83	2,21	1,65	1,90
AUC	\bar{x}_g	4,602	6,051	6,940	1,581
	SF	1,74	1,82	1,52	1,96

Tabelle 51: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe von 240 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,012	0,012	0,012	0,012
	SF	1,62	1,62	1,62	1,62
GLW	\bar{x}_g	0,033	0,081	0,065	0,026
	SF	1,82	2,27	2,08	1,81
0	\bar{x}_g	0,184	0,290	0,211	0,029
	SF	6,14	7,33	7,20	2,55
5	\bar{x}_g	0,303	0,476	0,440	0,074
	SF	6,41	6,99	7,27	2,76
15	\bar{x}_g	0,408	0,668	0,664	0,163
	SF	4,85	5,23	5,25	2,89
30	\bar{x}_g	0,505	0,809	0,791	0,268
	SF	3,77	4,11	4,29	2,96
AUC	\bar{x}_g	11,792	18,976	18,306	4,678
	SF	4,72	5,13	5,22	2,90

Tabelle 52: Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Karunkelgewebe von 270 Tagen tragenden Kühen ($n = 3$). Angegeben ist die Substratumwandlung in pmol pro g Protein. Die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat wurde in der Kernfraktion (S1), der Mitochondrienfraktion (S2), der Mikrosomenfraktion (S3) und im Cytosol gemessen. Angabe der logarithmisch transformierten Meßwerte als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF) nach Rücktransformation.

Inkubationsansatz		S1	S2	S3	Cytosol
MLW	\bar{x}_g	0,024	0,024	0,024	0,024
	SF	1,15	1,15	1,15	1,15
GLW	\bar{x}_g	0,042	0,118	0,103	0,059
	SF	1,02	1,46	1,75	2,99
0	\bar{x}_g	0,278	0,333	0,215	0,033
	SF	2,56	1,73	1,78	1,22
5	\bar{x}_g	0,672	0,684	0,574	0,108
	SF	1,65	2,63	2,33	1,31
15	\bar{x}_g	0,857	0,777	0,747	0,216
	SF	1,25	2,97	2,83	1,33
30	\bar{x}_g	0,934	0,812	0,802	0,369
	SF	1,13	2,97	2,90	1,27
AUC	\bar{x}_g	23,643	21,898	20,526	6,379
	SF	1,32	2,81	2,62	1,27

Tabelle 53: Statistische Auswertung (dreifaktorielle Varianzanalyse) der Ergebnisse der Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat durch subzelluläre Fraktionen aus Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe. Es wurden der Einfluß der Trächtigkeitsdauer (T-Dauer), der subzellulären Fraktionen (Aufbereitung) und der Gewebeherkunft (Herkunft) auf die Hydrolyse von ^3H -Estronsulfat, sowie die Wechselwirkungen zwischen den drei Einflußfaktoren untersucht. P(AT) steht für die Wechselwirkung zwischen der Aufbereitung und der T-Dauer, p(HT) für die Wechselwirkung zwischen der Herkunft und der T-Dauer und p(AHT) für die Wechselwirkung zwischen allen drei Faktoren.

Inkubationszeit	p (T-Dauer)	p (Aufbe- reitung)	p (AT)	p (Her- kunft)	p (HT)	p (AH)	p (AHT)
0 min	n.s.	<0,001	n.s.	0,03	n.s.	<0,001	n.s.
5 min	n.s.	<0,001	n.s.	<0.01	n.s.	<0,001	n.s.
15 min	n.s.	<0,001	n.s.	0,05	n.s.	<0,01	n.s.
30 min	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	0,02	n.s.
AUC	n.s.	<0,001	n.s.	0,04	n.s.	<0,001	n.s.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. B. Hoffmann für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung vorliegender Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. G. Schuler, der diese Arbeit betreute und während der Abfassung immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn A. Vielemeier, für die freundliche Einarbeitung in die Methodik sowie ihm, Herrn W. Damm, Frau C. Schumacher und den hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern und Kollegen / innen, die bei der Gewinnung und Verarbeitung des Probenmaterials tatkräftig mitgeholfen haben.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Biomathematik und Datenverarbeitung insbesondere Herrn Failing danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Frau R. Klein danke ich für die gewährten Einblicke in die Geheimnisse der Computerarbeit.

Schließlich möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern und meinem Freund F. Mörschel ganz herzlich für ihre Geduld und Unterstützung danken.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie der Kogge-Stiftung durchgeführt.